



**HAL**  
open science

# Dynamique spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques côtières et de leurs caractéristiques intrinsèques, à partir d'une approche automatisée à haute résolution

Arnaud Louchart

► **To cite this version:**

Arnaud Louchart. Dynamique spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques côtières et de leurs caractéristiques intrinsèques, à partir d'une approche automatisée à haute résolution. Biodiversité et Ecologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2020. Français. NNT : 2020DUNK0556 . tel-03052340

**HAL Id: tel-03052340**

**<https://theses.hal.science/tel-03052340>**

Submitted on 10 Dec 2020

**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.



Ecole doctorale n° 104 : Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

## Thèse de doctorat

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université du Littoral - Côte d'Opale  
Discipline « Biologie de l'environnement, des populations, écologie »

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Arnaud Louchart**

le 24 juillet 2020

**Dynamique spatio-temporelle des communautés  
phytoplanctoniques côtières et de leurs caractéristiques  
intrinsèques, à partir d'une approche automatisée à haute  
résolution**

### Membres du jury

#### Rapporteurs :

Mme Nathalie Simon ..... MCF HDR, Sorbonne Université, SBR (FR)

M. Philippe Grosjean..... Pr., Université de Mons (BE)

#### Examineurs :

Mme Urania Christaki..... Pr., Université du Littoral Côte d'Opale, LOG (FR)

M. Duncan Purdie ..... Pr., Université de Southampton, NOC (UK)

Mme Mélilotus Thyssen..... CR, CNRS, MIO (FR)

Mme Véronique Créach ..... CR, CEFAS (UK)

#### Directeurs de thèse :

M. François G. Schmitt .....DR, CNRS, LOG (FR)

M. Luis Felipe Artigas ..... MCF, Université du Littoral Côte d'Opale (FR)



Cette thèse a été co-financée à 50% par la Région « Hauts-de-France » et à 50% par l'Université du Littoral-Côte d'Opale, pour une durée de trois ans.







*“Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree, it will live its whole life believing that it is stupid.”*

*- Albert Einstein*



## Remerciements

Ces quelques lignes sont adressées à ceux qui m'ont aidé et encouragé pendant ces presque quatre années de doctorat. Je n'oublierai pas non plus ceux qui ont dû me subir durant toute ou partie de ce travail...

Mes premiers remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse, Felipe et François. Je les remercie de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail ainsi que de leur patience et de leur expérience du monde de la science, mais également de m'avoir appris la rigueur scientifique. Je remercie Felipe de m'avoir fait participer activement au projet JERICO-NEXT et au CPER MARCO, et emmené un peu partout durant cette thèse dans lesquels j'ai énormément appris, rencontré des personnes et scientifiques incroyables.

Merci à l'Université du Littoral Côte d'Opale et à la Région « Hauts-de-France » qui m'ont octroyé les deux demi bourses doctorales afin de mener ce projet à bien.

Mes troisièmes remerciements sont naturellement adressés à ma famille : ma mère, mon père et mes frangines (Pauline et Agathe). Vous m'avez tous toujours soutenu tout au long de ce projet et je vous en serai éternellement reconnaissant. Ça n'a parfois pas été simple, mais vous avez toujours été là, prêts à m'écouter et accepter le chemin que j'ai choisi. Enfin, je suis ravi que vous voyiez l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également les « PI », capitaines et collègues embarquant lors des campagnes de JERICO-NEXT, mais aussi les collaborateurs dans JERICO-NEXT. Sans eux, il n'y aurait pas eu de données ni d'éléments de discussion pour ce travail...

Je remercie aussi les membres de mon Comité de Suivi de Thèse (Alain, Fabrice, Lotty et Véro) pour leur expertise scientifique, les discussions ainsi que les idées que vous m'avez données.

Je tiens aussi à remercier Fabrice. Ce fut toujours sympathique de se retrouver hors labo, à déguster les nouveautés du « singe » et de la « cave » en parlant souvent sciences certes, mais aussi musique et de rock : « La pression on ne la subissait pas, on la buvait » ! Et sinon, pour le fameux road-trip Wimereux-Helsinki... en voiture... A/R...soit 5500km, avec une campagne océano entre deux... Merci de m'avoir partagé tes connaissances en stats.

Merci aussi à Raffaella Casotti qui m'a permis de continuer ces travaux de thèse pendant mon séjour à Naples.

Je tiens maintenant à féliciter mes collègues de la team Felipe, Guillaume (mon frère de thèse dixit Felipe), Emeline (alias Mamie-Meuh) et Marie (connue comme étant Tom Pouce), de m'avoir subi pendant toute ou partie de la thèse, tous toujours prêts à discuter de recettes de grand-mère des 10h du matin dans le bureau des « gros du fond », qui font qu'on avait en permanence faim. Ceci ayant largement contribué à la prise du deuxième petit dej' au bureau avec les pains au chocolat, ainsi qu'au goûter avec les bonnes préparations des volontaires

désignés. Merci à eux d'avoir contribué à ma (bonne ?) santé mentale avec les blagues qu'on a pu se faire (toujours avec notre cher Vincent Cornille dans le coup). Merci également aux autres collègues étant passés par le bureau pendant ma thèse : Emilie, Jessica, Claire et les deux Alex. Et aussi, un grand merci à Momo qui m'a presque tout appris de la cyto. D'ailleurs il fallait que je le mette quelque part, mais « la cyto c'est comme le vélo, ça s'oublie pas » (Guillaume Wacquet, ca. 2018).

Je me devais de dédier une partie à un groupe en particulier : le groupe rando avec Julien, Jeanne et Chris (pour la découverte de Kaamelott aussi). Simplement parce qu'on a vécu de sacrées aventures ensemble, de beaux défis physiques (Tour du Mont Blanc et GR20), des moments uniques ! Un peu comme ce travail : unique, intense et un sacré défi intellectuel. Maintenant que mon aventure personnelle touche à sa fin, j'ai hâte de repartir avec vous mes amis !

Je ne pouvais pas t'oublier, mais merci à mon ancien collègue post-doc et pote Alex Budria. Quelques mois ont suffi pour qu'on s'entende bien. Tu es probablement le mec avec la plus grosse culture scientifique (avec Felipe) que j'ai pu connaître. Toujours des anecdotes marrantes, des conseils scientifiques incroyables et de bons coups à boire ensemble.

Je remercie également mes amis François, Zul, Alex, Amandine, Bamboo, Mathilde, Etienne, Claire, Justine pour leur support et pour les soirées « samedi gras ». Les moments de rigolade après la semaine bien chargée et le stress permanent. Heureusement que vous étiez là vous aussi.

Comment oublier les deux zouaves de la campagne PHYCO, Julien et Axel, deux gars adorables mais fous, les bières-belottes de fin de journée lors de la campagne PHYCO. Julien étant d'ailleurs la personne ayant qualifié au mieux ma fonction de phytoplanctonologue comme étant « un pêcheur d'eau ».

Merci à Jules et Micha pour les soirées d'écriture boulonnaises qui n'ont pas duré longtemps. Ce fut court mais intense !

Il s'est passé tellement de choses durant cette période que j'ai certainement omis des détails au cours de cette épopée. Je tiens alors à remercier dans ce paragraphe toutes les personnes n'étant pas mentionnées ci-dessus, mais qui ont gravité autour de ma thèse ou de moi pendant ces presque quatre années.

Enfin, je remercie chaleureusement les membres du jury. Philippe Grosjean et Nathalie Simon pour avoir été rapporteurs de ce travail. Véronique Créach, Mélilotus Thyssen, Duncan Purdie et Urania Christaki pour avoir été examinateurs. Merci encore à Urania d'être Présidente du Jury de thèse.





# Sommaire

Chapitre I : Introduction .....	1
<b>1. Le phytoplancton</b> .....	1
1.1. Généralités .....	1
1.2. Classifications et caractéristiques du phytoplancton .....	5
1.3. Les niches écologiques et le paradoxe du phytoplancton .....	14
<b>2. La variabilité spatio-temporelle</b> .....	17
2.1. Les facteurs régissant la distribution spatiale et temporelle .....	17
2.2. L'importance des échelles d'études spatiale et/ou temporelle dans l'étude du phytoplancton .....	21
<b>3. Objectifs et cadre de la thèse</b> .....	24
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	31
<b>1. Les sites d'étude</b> .....	31
1.1. Manche/sud de la Mer du Nord .....	32
1.2. Mer Baltique.....	39
<b>2. Les campagnes océanographiques</b> .....	42
2.1. Campagne CAMANOC – Manche occidentale/Manche centrale – Eté 2014.....	42
2.2. Campagnes PHYCO, VLIZ, RWS – Manche orientale/sud Mer du Nord – Printemps 2017	43
2.3. Campagne Aranda – Mer Baltique/Kattegat/Skagerrak – Eté 2017 .....	44
<b>3. La cytométrie en flux</b> .....	45
3.1. Etat de l'art .....	45
3.2. Application de la cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » dans l'étude <i>in vivo</i> du phytoplancton dans le milieu .....	47
3.3. Principe.....	48
<b>4. La cytométrie en flux automatisée de type « pulse shape-recording »</b> .....	49
4.1. Vocabulaire .....	49
4.2. Unité fluidique.....	51
4.3. Unité optique .....	53
4.4. Unité électronique .....	54
<b>5. Analyse des données cytométriques</b> .....	55
5.1. Analyse manuelle .....	56



5.2.	Clusterisation automatisée supervisée.....	59
5.3.	Le contrôle qualité du cytomètre et des données.....	60
5.4.	Les groupes cytométriques.....	64
5.5.	Les traits morpho-physiologiques dérivés des traits optiques.....	72
<b>6.</b>	<b>Comparaison des méthodes d'analyse.....</b>	<b>78</b>
6.1.	Inter-comparaison de trois cytomètres automatisés.....	78
6.2.	Inter-comparaison des méthodologies de classification (manuelle vs. automatisée).....	84
<b>Chapitre III : Distribution du phytoplancton, à fine résolution spatiale et temporelle, en Manche occidentale et en Manche centrale. ....</b>		<b>91</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>100</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>104</b>
2.1.	Cruise outlines.....	104
2.2.	Stratification and mixing of water masses.....	105
2.3.	Plankton analysis.....	106
2.4.	Statistical analysis and mapping.....	108
<b>3.</b>	<b>Results.....</b>	<b>110</b>
3.1.	Hydrobiology.....	110
3.2.	Phytoplankton abundance, fluorescence and spatial distribution.....	114
3.3.	Phytoplankton communities structure analysis.....	119
3.4.	Variance partitioning.....	124
3.5.	Scale of variability of phytoplankton communities.....	126
<b>4.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>128</b>
4.1.	Water masses.....	128
4.2.	Phytoplankton communities.....	129
4.3.	Environment vs. spatial variations.....	133
4.4.	Spatial structure analysis.....	135
<b>5.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>136</b>
<b>Chapitre IV : Niches spatialisées des groupes phytoplanctoniques en Manche orientale - sud de la Mer du Nord, en situation de bloom printanier .....</b>		<b>139</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>149</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>153</b>
2.1.	Cruises outlines.....	153
2.2.	Discrete measurements.....	154
2.3.	Underway measurements.....	155

2.4.	Data analysis.....	157
<b>3.</b>	<b>Results.....</b>	<b>161</b>
3.1.	High frequency flow cytometry.....	161
3.2.	LCBD and water masses .....	166
3.3.	Niche analysis.....	169
3.4.	Overlap of the niches.....	173
3.5.	Relation between niche and spatial analysis.....	175
<b>4.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>175</b>
4.1.	High frequency/Spatiotemporal distribution .....	175
4.2.	Niche distribution and overlap .....	180
4.3.	SCBD and niche .....	185
<b>5.</b>	<b>Conclusion and perspectives.....</b>	<b>186</b>
Chapitre V : Etude de paramètres conditionnant la distribution verticale, à petite échelle, des groupes phytoplanctoniques le long d'un gradient de salinité. ....		189
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>200</b>
<b>2.</b>	<b>Material and methods .....</b>	<b>205</b>
2.1.	Study area.....	205
2.2.	Vertical and horizontal sampling.....	205
2.3.	Phytoplankton functional groups (PFG) estimated by flow cytometry .....	206
2.4.	Statistical analysis .....	208
<b>3.</b>	<b>Results.....</b>	<b>211</b>
3.1.	Horizontal sub-surface distribution of Phytoplankton Functional Groups.....	211
3.2.	Vertical water column distribution of Phytoplankton Functional Groups.....	214
3.3.	Niche and subniche parameters .....	217
3.4.	db-MEM .....	220
3.5.	PCoA Traits from the PFGs traits .....	220
3.6.	Community models .....	223
<b>4.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>226</b>
4.1.	Community composition in the horizontal and vertical gradient .....	226
4.2.	Environmental subsets and spatial PFG characteristics .....	231
4.3.	Community model.....	234
<b>5.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>239</b>
Chapitre VI : Discussions/Perspectives .....		243
Conclusion générale .....		273

References .....	275
Annexes .....	309

## Liste des illustrations

- Figure 1 : Contrôle microbien des flux de carbone océanique. 1) Photosynthèse ; 2) relargage de la matière organique dissoute (DOM) et de la matière organique particulaire (POM) ; 3) consommation du phytoplancton par le zooplancton ; 4) minéralisation et recyclage de la matière organique dans la boucle microbienne ; 5) pompe à carbone microbienne ; 6) pompe biologique : export de la matière organique particulaire de la surface vers les couches profondes et 7) la contamination virale qui permet le relargage de la matière dissoute et particulaire lors de la lyse cellulaire du phytoplancton et des bactéries. D'après Buchan et al. (2014)..... 3
- Figure 2 : Classes de taille chez le plancton. L'encadré rouge regroupe les classes de taille du phytoplancton. Tiré de (Sieburth et al., 1978)..... 6
- Figure 3 : Relation entre la turbulence, les nutriments et les caractéristiques des réseaux trophiques basés sur Margalef (1978) et modifié par ajout des formes de vie chez le phytoplancton (Cullen et al., 2002). ..... 7
- Figure 4 : Représentation graphique de la performance écologique. Elle correspond à l'optimum ou l'étendue de la distribution d'un des trois traits performance le long d'un gradient environnemental. Tiré de Violle et al (2007)..... 9
- Figure 5 : Catégorisation des différents traits chez le phytoplancton en fonction du type de trait et de leur fonction écologique. D'après Litchman & Klausmeier (2008). ..... 10
- Figure 6 : Comparaison des gammes de taille chez le phytoplancton en relation avec des objets macroscopiques. Tiré de Finkel et al. (2010). ..... 11
- Figure 7 : Spectre d'absorption de la lumière chez les pigments photosynthétiques. Tiré de Yarish, Redmond, & Kim (2012)..... 12
- Figure 8 : Représentation entre la niche et la distribution des espèces. Chaque ellipse représente la niche pour deux facteurs environnementaux considérés ( $e_1$  et  $e_2$ ). Selon la niche Hutchinsonienne, une espèce est absente de la portion de sa niche partagée avec un compétiteur dominant (ligne en pointillés représente la niche d'un compétiteur dominant). Les « plus » représentent la présence d'une espèce dans un patch de l'habitat le long des gradients environnementaux  $e_1$  et  $e_2$ . Les « ronds » représentent l'absence d'une espèce dans un patch de l'habitat le long des gradients environnementaux  $e_1$  et  $e_2$ . Tiré de Pulliam (2000) ..... 16
- Figure 9 : Interactions entre les facteurs externes affectant le phytoplancton. D'après Häder et Gao (2015). ..... 17
- Figure 10 : Echelles spatiales d'interactions entre les processus biologiques et physiques en écologie du plancton. Les rectangles bleus correspondent aux processus physiques. Les rectangles rouges correspondent aux processus biologiques. Tiré de Prairie et al. (2012) ..... 22
- Figure 11 : Diagramme de Stommel des échelles spatiales et temporelles des phénomènes biophysiques ainsi que les moyens d'études. Le gradient de transparence fait référence au niveau de complexité

écologique que fournissent les moyens d'échantillonnage. Tiré et modifié de Kavanaugh et al. (2016). La technique utilisée dans cette thèse est représentée par le rectangle hachuré. .... 24

Figure 12 : Schéma conceptuel des axes de la thèse pour répondre à la problématique de la distribution spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques en systèmes côtiers à sub-mésoséchelle. .... 27

Figure 13 : Schéma des principaux fronts thermohalins retrouvés sur le plateau continental des eaux de l'Europe du nord-est (d'après Hill et al., 2008). La zone grisée représente la zone d'étude en Manche-Mer du Nord. Les régions en bleu clair sont les régions subissant une stratification thermique. Les régions en orange sont les régions subissant une stratification thermohaline. Les numéros 1, 2 et 3 en noir, correspondent aux subdivisions géographiques de la Manche, respectivement Manche orientale, Manche centrale et Manche occidentale. Les flèches vertes représentent les courants le long du plateau continental. Les flèches rouges, représentent les courants à proximité des fronts et leur direction. Leurs numéros associés correspondent aux fronts. 1. Front d'Ouessant ; 2. Front de la Mer Celtique ; 3. Front d'Islay ; 4. Front des îles Shetland ; 5. Front de Flamborough Head ; 6. Front Firsian. .... 33

Figure 14 : Gauche : Courants résiduels de marée de surface en Manche, issus d'un modèle, d'après Ménesguen & Gohin (2006). Droite : Courants résiduels de marée de surface en Mer du Nord tiré du rapport de la commission OSPAR (2000) et d'après Turrell (1992). Les flèches orange indiquent les eaux uniquement provenant de l'Océan Atlantique. Les flèches noires indiquent les eaux atlantiques mélangées aux eaux côtières. .... 35

Figure 15 : Modélisation sur 3 ans des variations spatio-temporelles de la température (°C) et du front d'Ouessant en Manche, moyennées par mois sur une année (d'après Hoch et Garreau, 1998). .... 37

Figure 16 : Gradients de maxima d'abondance de *Phaeocystis* spp. (million de cellules par litre) en sud de la Mer du Nord pendant la période avril-août des années 1990 à 2014. Disponible sur le site internet d'OSPAR. .... 39

Figure 17 : Carte de la Mer Baltique, localisation des sous-régions et des principaux fleuves (d'après André, 2012). En rouge, zone du front du Skagerrak, séparant le Skagerrak (Mer du Nord) du Kattegat. .... 41

Figure 18 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors de la campagne CAMANOC (16 septembre au 13 octobre 2014). La Manche est subdivisée en Manche occidentale (1), Manche centrale (2) et Manche orientale (3). .... 43

Figure 19 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors des campagnes PHYCO (21 au 30 avril 2017), VLIZ (8 au 12 mai 2017) et RWS (15 au 18 mai 2017). .... 44

Figure 20 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors de la campagne ARANDA en Mer Baltique (10 au 17 juillet 2017). .... 45

Figure 21 : Principe de la cytométrie en flux et interopérabilité des différents systèmes (fluidique, optique, électronique et si disponible tri). FSC représente le « forward scatter » et SSC représente le « sideward scatter ». Tiré du site internet du plateau technique de cytométrie en flux de l'université de Reims. .... 49

Figure 22 : Principe de l'enregistrement du « pulse shape » du CytoSense. Tiré de <a href="https://www.cytobuoy.com">https://www.cytobuoy.com</a> .....	50
Figure 23 : Principe de la focalisation hydrodynamique. La section conique permet au liquide gaine d'accélérer de 1 cm.s <sup>-1</sup> à 200 cm.s <sup>-1</sup> . L'accélération du liquide gaine génère un flux laminaire qui entraîne l'étirement de l'échantillon en un flux de particules en file indienne.....	52
Figure 24 : Schéma des neuf attributs (longueur, total, maximum, moyenne, inertie, nombre de cellules, asymétrie, centre de gravité et facteur de remplissage) calculés par CytoClus <sup>®</sup> pour chacun des cinq signaux (FWS, SWS, FLR, FLO et FLY). .....	56
Figure 25 : Données de la campagne du Rijkswaterstaat A. Relation entre le logarithme du volume analysé (mL) et le logarithme de l'abondance (cell.mL <sup>-1</sup> ) . B. Distance de Cook à partir des résidus. La ligne en pointillés rouges définit le seuil de suspicion. Sur les 2 graphiques, les points noirs représentent les échantillons où les résidus sont en-dessous du seuil de suspicion. Les points blancs représentent les échantillons où les résidus sont au-dessus du seuil de suspicion. ....	63
Figure 26 : Cytogrammes utilisés pour la caractérisation des groupes phytoplanctoniques fonctionnels en Manche/Mer du Nord (A, B, C) et Mer Baltique (D, E, F). .....	68
Figure 27 : Profil optique d'une colonie de cellules du genre Pseudo-nitzschia et son image associée (campagne PHYCO, prise le 29/04/2017 à la station PHY40 située en face de l'estuaire de la Somme). .....	71
Figure 28 : Abondance (cell.mL <sup>-1</sup> ) des cinq groupes phytoplanctoniques définie lors de la campagne LifeWatch-VLIZ. A) Pico-Red, B) Nano-Red, C) Micro-Red, D) Pico-Synecho, E) Nano-Crypto, F) Abondance totale phytoplanctonique. L'alternance entre les bandes sombres et claires indique l'alternance jour-nuit. ....	81
Figure 29 : Influence du seuil de détection appliqué sur le sideward scatter (SWS) sur l'estimation de la longueur de la particule (L et L'). Le SWS et le FWS scatter étant colinéaires pour ce qui est de la longueur. Aucun seuil de détection n'est appliqué sur la figure de gauche tandis qu'un seuil de détection est appliqué sur la figure de droite. ....	84
Figure 30 : Zones de chevauchement caractérisées par différentes méthodes de classification (manuelle et automatisée) pour quatre groupes phytoplanctoniques (Synechococcus, picoeucaryotes, nanoeucaryotes et microphytoplancton). La zone noire correspond à la zone commune aux quatre classifications. ....	87
Figure 31 : Abondance relative (ligne supérieure) et contribution relative à la fluorescence totale (ligne inférieure) pour les quatre groupes phytoplanctoniques caractérisés lors de la campagne du VLIZ (08 au 12 mai 2017) par la méthode automatisée (1 <sup>ère</sup> colonne) et la méthode manuelle (2 <sup>ème</sup> colonne). .....	88
Figure 32 : Exemple de profils optiques observés dans le microphytoplancton et montrant la diversité de ces profils. Echantillon R1 du 19-05-2016 de la radiale de la Baie Saint Jean-Slack (campagnes DYPHYRAD). .....	90
Figure 33 : Continuous recording every 10 minutes by a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM) during the CAMANOC cruise from Sept. 16th (blue dots) to Oct. 16th (red dots) and 78 discrete (CTD)	

stations (brown dots). Dashed lines correspond to geographical separation of the main regions: Celtic Seas (including Irish and Iroise Sea), Western English Channel and Central English Channel. .... 105

Figure 34 : Cytograms allowing the characterisation of different phytoplankton groups. (A) Total Orange Fluorescence (TFLO) vs. Total Sideward Scatter (Total SWS). (B) Total Red Fluorescence (TFLR) vs. Total Forward Scatter (Total FWS). (C) Ratio of Total Yellow Fluorescence over Total Red Fluorescence and Total Orange Fluorescence over Total Red Fluorescence (TFLY/TFLR)/(TFLO/TFLR). (D) Total Orange Fluorescence (TFLO) vs. Total Yellow Fluorescence (TFLY). Clusters of single, doubles and triples of beads of 3  $\mu\text{m}$  are merged here. .... 108

Figure 35 : Continuous recording of: A. Salinity, B. Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) C. Turbidity (NTU) D. Chlorophyll in vivo Fluorescence ( $\mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ). .... 111

Figure 36 : A. Identification of water masses based on results from the Euclidean distance matrix on temperature, salinity, turbidity and in vivo chlorophyll fluorescence. B. Stratification, value of  $N^2$ , as derived from CTD casts. The dashed line distinguishes homogeneous water masses from heterogeneous water masses and marks the front..... 113

Figure 37 : Spatio-temporal distribution of the abundance of the eight phytoplankton groups characterised by the PSFCM. .... 117

Figure 38 : Distribution of the abundance in relation to the distance to the Ushant front (km) for the eight phytoplankton groups characterised by the CytoSense. The dashed line represents the position of the inner thermal front. Negative distance represents samples at the West of the front. Positive distance represents samples at the East of the front. .... 118

Figure 39 : Phytoplankton communities based on the results of the fusion between Jaccard similarity matrice on the abundance and red fluorescence. .... 119

Figure 40 : Relative contribution of phytoplankton, A. abundance and B. total red fluorescence, within each community. Only the percentage above 1% are displayed. .... 121

Figure 41 : Patterns in size structure and fluorescence of phytoplankton groups amongst different communities defined in the English Channel. A. Log-log relationship between phytoplankton abundance and the red fluorescence per cell, per group and per community, B. Log-log relationship of the red fluorescence per cell (FLR) against the phytoplankton size scaling per group and per community, C. Log-log relationship between phytoplankton cell size and abundance per group and per community, D. Log-log relationship of the orange fluorescence per cell (FLO) against the red fluorescence per cell (FLR) per phytoplankton group and per community..... 124

Figure 42 : Mantel Correlogram of pairwise similarity in phytoplankton communities (Jaccardized Czekanowski similarity based on the abundance and average total red fluorescence per cluster) against geographical distance (Euclidean distance)..... 127

Figure 43 : Studied area of PHYCO (CNRS-LOG), JERICO-NEXT/LifeWatch (VLIZ) and MONISNEL (RWS) cruises in the Eastern English Channel (PHYCO and JN/LW cruises) and Southern North Sea and Wadden Sea (JN/LW and MONISNEL cruises) from April 21 to May 17, 2017. Black dots represent the continuous measurements recorded with the thermosalinometer and the CytoSense flow cytometer. Red dots represent the stations investigated during the three cruises. .... 154

Figure 44 : Spatial-temporal distribution of the phytoplankton groups sorted by the automated pulse shape-recording flow cytometer during the PHYCO cruise (04/21 to 04/30), the VLIZ cruise (05/08 to 05/11) and the RWS cruise (05/15 to 05/18).....	163
Figure 45 : Variance partitioning of the overlapped areas: A. between PHYCO and VLIZ cruises; B. between VLIZ and RWS cruises .....	164
Figure 46 : Map of the LCBD index values calculated on the abundance of the phytoplankton functional groups defined by PSFCM. Transparent dots correspond to non-significant LCBD values. Filled dots correspond to significant LCBD values. ....	166
Figure 47 : A. Water masses discriminated from temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry; B. Boxplot of the LCBD values in each water mass and their relations after Mann-Whitney and Tukey-HSD post hoc tests ( $p < 0.05$ ). ....	167
Figure 48 : Species Contribution to Beta Diversity (SCBD) of each phytoplankton functional groups among the eight water masses. SCBD is expressed in percent. The eleven PFGs are Synechococcus (Sync), PicoVeryLowFLR (PVLF), PicoLowFLR (PLFL), PicoHighFLR (PHFL), Cryptophytes (Cryp), Coccolithophores (Cccl), NanoLowFLR (NLFL), NanohighFLR (NHFL), NanoVeryHighFLR (NVHF), Pseudo-nitzschia (Ps.N), Microphytoplankton (Micr).....	169
Figure 49 : Outlying Mean Index (OMI) analysis of the eleven phytoplankton functional groups (PFG) characterized by the automated pulse shape-recording flow cytometry according to the four continuously-recorded environmental parameters. Bathymetry was removed from the plot because it was not significantly involved in the analysis. ....	171
Figure 50 : Kernel Density Estimation plots showing the frequency of abundance of each Phytoplankton Functional Group related to nutrient ratios. The dashed lines represent the logarithm of the Redfield ratios (i.e. N:P = 16; Si:P = 16; Si:N = 1). ....	173
Figure 51 : Upper Correlation matrix representing pairwise overlap between the different phytoplankton functional groups defined by automated pulse shape-recording flow cytometry. Blue gradient, from light blue to dark blue shows the increase in niche overlap. Below 0.45, the Schoener index is low; from 0.45 to 0.59, values are intermediate and above 0.60, values of the Schoener index are high.....	174
Figure 52 : Map of the 17 stations investigated in the Baltic Sea and in the Skagerrak-Kategatt during the Aranda cruise (10 to 17 July 2017). The cruise has started and finished in Helsinki (Gulf of Finland) and crossed the Baltic Sea to station A13 (Skagerrak).....	206
Figure 53 : Horizontal distribution of the Phytoplankton Cytometric Groups logarithmic abundance characterized in the Baltic Sea. Note that for some groups (NanoLowORG, NanoHighORG, MicroORG and MicroRED), we refer to cell mL <sup>-1</sup> but they could also be colonies mL <sup>-1</sup> .....	212
Figure 54 : Principal Component Analysis on the communities recorded continuously at the subsurface. The color gradient was established according to the longitude of the samples. Light blue corresponded to western samples and dark blue corresponded to eastern samples. ....	213
Figure 55 : Vertical distribution of Phytoplankton Functional Groups (PFG) along the cruise (“x” axis = distance travel by the vessel since the start of the cruise). A. PicoORG; B. PicoLowFLR; C.	



PicoHighFLR; D. NanoLowFLR; E. NanoHighFLR; F. NanoLowORG; G. NanoHighORG; H. NanoSWS; I. MicroORG; J. MicroRED. The white dashed curve represents the euphotic depth calculated from the PAR of the CTD. The black dashed curve represents the mixed layer depth calculated from the temperature data of the CTD. .... 217

Figure 56 : Factorial plan of the OMI analysis (contribution of OMI 1 and OMI 2 axes = 97.2% of the total of the variance) and the confident ellipses (representing 95% of the environmental gradient) of each sampling depth of the Kattegat/Skagerrak and the Baltic Proper/Gulf of Finland subset. “Bal” sampling grouped Baltic Proper and Gulf of Finland sampling stations and “Kat” grouped Kattegat and Skagerrak sampling stations. The digits were related to the sampling depths. Note: the PCA displayed in the corner and the OMI analysis are using the same factorial plan. .... 218

Figure 57 : PCoA ordination plot showing the distance amongst the PFGs characterized in the discrete stations and based on 10 traits for the two first axis. One PCoA was drawn for each subset and each depth. .... 222

Figure 58 : Relation entre SCBD et caractéristiques intrinsèques des groupes cytométriques lors des campagnes PHYCO, VLIZ et RWS. Les données sont les données moyennées par masse d'eau (NP : marginalité, NB : tolérance environnementale, traits)..... 265

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des principales spécifications techniques des appareils utilisant un système d'imagerie. Tiré du rapport JERICO-NEXT sur les nouvelles méthodes pour les observations automatisées in situ de la diversité phytoplanctonique (Karlson et al., 2017). .....	59
Tableau 2 : Combinaisons d'axes permettant de caractériser les groupes fonctionnels phytoplanctoniques et leur correspondance avec le vocabulaire disponible sur SeaDataNet. En noir, les groupes communs à la Mer Baltique et à la Manche/Mer du Nord. En bleu, les groupes uniquement caractérisés en Manche/Mer du Nord. En orange, les groupes uniquement caractérisés en Mer Baltique. ....	66
Tableau 3 : Liste des traits cytométriques (combinaison entre un attribut et un signal, parfois rapport entre des combinaisons attributs-signaux) servant à caractériser les groupes fonctionnels cytométriques avec leur signification technique, leur correspondance écologique ainsi que leur niveau d'application. Les signaux utilisés sont FWS pour le forward scatter, SWS pour le sideward scatter, FLR, FLO et FLY respectivement pour la fluorescence rouge, orange et jaune. Tableau tirée de Fragoso et al. (2019). ..	75
Tableau 4 : Configuration des trois cytomètres automatisés et des protocoles utilisés lors de la campagne LifeWatch-VLIZ (08 au 12 mai 2017). .....	82
Tableau 5 : Coefficient de Spearman entre la méthode de classification automatisée et le gating manuel pour l'abondance et la fluorescence rouge totale par groupe et global, lors de la campagne du VLIZ (08 au 12 mai 2017). .....	89
Tableau 6 : Minimum and maximum values of temperature, salinity, turbidity and in vivo chlorophyll fluorescence (Chl Fluor) among the 5 water masses. ....	112
Tableau 7: Variation partitioning of phytoplankton community (Environment including temperature, salinity and turbidity; space including abiotic interactions, physical processes and unexplained environment). .....	125
Tableau 8 : Mean $\pm$ sd of the size of the eleven phytoplankton functional types during PHYCO, VLIZ and RWS cruise. ....	161
Tableau 9 : Mean $\pm$ sd of the environmental variables (temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry) among the eight regions. ....	167
Tableau 10 : Niche parameters of the phytoplankton functional groups characterized in this survey. ....	170
Tableau 11 : Beta regression analysis of two responses variables: Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) and Species Contribution to Beta Diversity (SCBD). The LCBD was explained by the continuous environmental data. The SCBD was explained by the PFG niche features (niche position and niche breadth). SE: Standard Error; df: degree of freedom; z: z-statistic (estimate divided by SE) and p: probability value. ....	175

Tableau 12 : Reduced generalized linear model based on the Akaike Information Criterion for each depth in the Bal area (Baltic Proper and Gulf of Finland)..... 224

Tableau 13 : Reduced generalized linear model based on the Akaike Information Criterion for each depth in the Kat area (Kattegat-Skagerrak)..... 226





# Chapitre I : Introduction

## 1. Le phytoplancton

### 1.1. Généralités

Le plancton désigne l'ensemble des organismes vivants portés par les marées et les courants, et dont la nage ne leur permet pas de lutter contre ces forces lors de leurs déplacements. En effet, bien que le plancton soit capable de se déplacer, sa vitesse relative par rapport aux forçages externes (turbulence, courant) ne lui permet généralement pas de lutter contre ces forçages. Toutefois, certains organismes planctoniques peuvent réaliser des mouvements actifs grâce à la présence d'organes de motilité (e.g. la présence de flagelles). Le plancton regroupe de nombreux organismes de taille, de forme, et d'intérêt écologique différents. Le phytoplancton, littéralement « plantes errantes » (*phytos* pour plantes et *planktos* pour errant) est un groupe polyphylétique d'organismes eucaryotes et procaryotes photoautotrophes et mixotrophes. Il englobe l'ensemble des organismes capables de capter l'énergie lumineuse au moyen de leurs pigments (structurels ou acquis par voies de symbiose ou kleptoplastidie) et de transformer cette énergie en énergie chimique nécessaire pour synthétiser leur propre matière organique, en réalisant ainsi la photosynthèse. Ce processus bioénergétique (Eq. 1) nécessite l'apport d'énergie lumineuse ( $h\nu$ ) et d'eau pour réduire le carbone inorganique ( $\text{CO}_2$ ) et former de la matière organique ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) nécessaire à leur métabolisme, ainsi que des nutriments inorganiques pour fabriquer les éléments nécessaires à leur croissance. Le phytoplancton représente environ 45% de la production primaire nette de la Terre (Falkowski, 1994; Falkowski et al., 1998; Gregg et al., 2003) et plus de 75% de la production primaire des océans (Falkowski et al., 2004) pour seulement 1% de la biomasse sur la Terre (Falkowski et al., 2003; Gregg et al., 2003). Ce rôle permet au phytoplancton d'occuper une place importante dans les écosystèmes en tant que base de la plupart des réseaux trophiques marins et étant considéré comme un puits de carbone inorganique, puisqu'il est capable de séquestrer ce carbone

via la photosynthèse et de transférer ce carbone via la pompe biologique. Par ce rôle, il est qualifié de régulateur du climat global.



Le phytoplancton est également impliqué dans de nombreux cycles biogéochimiques : cycle du carbone, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore, du silicium, du calcium (Falkowski, 1994; Falkowski et al., 1998; Gregg et al., 2003). Au sein des réseaux trophiques marins, plus de 99% des organismes sont liés de manière directe ou indirecte au phytoplancton comme source de nourriture. Il permet d'exporter la matière organique vers les niveaux supérieurs via la prédation. Cette pression de prédation affecte, en retour, la croissance, les processus cellulaires ainsi que la composition des communautés phytoplanctoniques (Lampert et al., 1986; Rassoulzadegan et al., 1988). Cette interaction est qualifiée de contrôle « top-down ». Néanmoins, les réseaux trophiques ne sont pas linéaires et résultent d'interactions complexes entre les organismes (réseaux trophiques incluant également les relations de parasitisme).

Le phytoplancton est aussi directement ou indirectement impliqué dans la boucle microbienne pélagique (Fig. 1). Il y produit de la matière organique dissoute (DOM = carbone organique dissout (DOC) + azote organique dissout (DON) + phosphate organique dissout (DOP)) et matière organique particulaire (POM = carbone organique particulaire (POC) + azote organique particulaire (PON) + phosphate organique particulaire (POP)) qui est mise à disposition via l'excrétion et également via la lyse cellulaire par exemple. La matière organique peut être utilisée pour fabriquer de la biomasse bactérienne et donner une production récupérée par le réseau trophique microbien et véhiculée vers les niveaux trophiques supérieurs (« boucle microbienne » de récupération de la matière organique détritique). Le résultat de ces réactions fournit du carbone organique disponible pour le réseau trophique et, en même temps, du carbone inorganique, à nouveau disponible pour le phytoplancton et qui peut se retrouver à nouveau dans l'atmosphère.

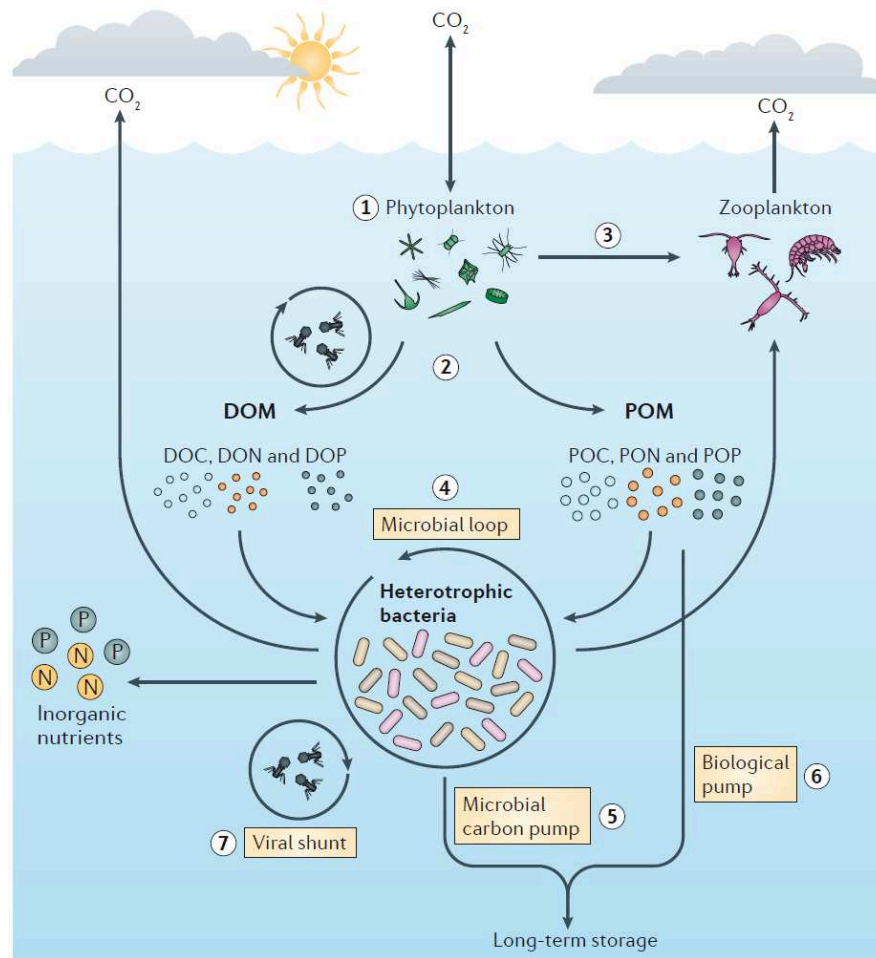


Figure 1 : Contrôle microbien des flux de carbone océanique. 1) Photosynthèse ; 2) relargage de la matière organique dissoute (DOM) et de la matière organique particulaire (POM) ; 3) consommation du phytoplancton par le zooplancton ; 4) minéralisation et recyclage de la matière organique dans la boucle microbienne ; 5) pompe à carbone microbienne ; 6) pompe biologique : export de la matière organique particulaire de la surface vers les couches profondes et 7) la contamination virale qui permet le relargage de la matière dissoute et particulaire lors de la lyse cellulaire du phytoplancton et des bactéries. D'après Buchan et al. (2014).

La dégradation de la DOM et de la POM par les procaryotes hétérotrophes va également entraîner la reminéralisation des nutriments sous des formes inorganiques, lesquels peuvent être à nouveau utilisés par le phytoplancton dans la production primaire régénérée. Cette production régénérée est à mettre en opposition à la production nouvelle qui correspond à l'utilisation des sels nutritifs issus de la reminéralisation des nutriments dans les couches profondes et ramenés vers la surface. Cette production nouvelle correspond également à l'apport en nutriment d'origine continentale. Ces



nutriments alimentant les productions nouvelles (incluant celle réalisée à partir d'apports continentaux, anthropogéniques ou pas) et régénérées exercent un contrôle de type « bottom-up », puisqu'ils régulent des paramètres métaboliques du phytoplancton. Etant donné l'importance qu'a le phytoplancton dans les écosystèmes marins, il apparaît nécessaire de déterminer l'abondance, la biomasse, la croissance et la productivité pour comprendre comment les communautés interagissent entre elles dans les écosystèmes et comment elles déterminent et influencent les cycles biogéochimiques ainsi que les niveaux trophiques supérieurs (e.g. Falkowski et al., 1998; Litchman, 2007; Litchman et al., 2007). La dynamique des populations phytoplanctoniques est marquée par les fluctuations de ces abondances, de la biomasse, et de la productivité qui sont le reflet de la croissance des différentes espèces dans un gradient de ressources (i.e. ensembles de paramètres environnementaux, contrôle « bottom-up »). De plus, la compétition vis-à-vis d'une ressource provoque le succès d'une espèce par rapport à d'autres. Dans ce cas, la pression de prédation s'accroît pour l'espèce la plus abondante (contrôle « top-down »). Ce mécanisme permet aux autres espèces de se maintenir dans l'écosystème. La disponibilité et les besoins en ressources couplés à la compétition provoquent des successions d'espèces et altèrent la diversité observée chez le phytoplancton. Plusieurs niveaux de diversité peuvent être calculés pour décrire les communautés : diversités spécifique, taxinomique, fonctionnelle et phénotypique, toutes pouvant être mesurées localement (diversité  $\alpha$ ), entre sites (diversité  $\beta$ ) ou régionalement (diversité  $\gamma$ ).

Le phytoplancton englobe une grande diversité d'organismes photo-autotrophes (diversité spécifique). En 2012, un inventaire fait état de 44 000 espèces décrites et une estimation de 72 500 espèces, aussi bien marines que d'eau douce (Guiry, 2012). On y retrouve différentes groupes (diversité taxinomique) comme les Cyanobacteries (du domaine Bacteria, procaryotes photosynthétiques oxygéniques aussi connus sous le terme « algues bleues »), des Rhodophytes (« algues rouges »), des Chlorophytes (« algues vertes »), des Cryptophytes, des Haptophytes (incluant les Coccolithophoridés ainsi que le genre *Phaeocystis*), des Ochrophytes et des Dinobiontes (dinoflagellés). En plus d'être caractérisés par une grande diversité taxinomique, ces différents groupes présentent une large diversité

de tailles, de formes mais également des cortèges pigmentaires différents, ce qui caractérise une grande diversité fonctionnelle. Cette diversité fonctionnelle se base sur les traits écologiques ou fonctionnels et permettent d'établir une classification selon ces traits.

## 1.2. Classifications et caractéristiques du phytoplancton

### 1.1.1. Classification du phytoplancton

Le fractionnement en classes de taille représente la classification la plus simple puisqu'elle ne nécessite pas d'expertise sur une quelconque classification ou identification du phytoplancton. La première proposition de classification sur la taille est donnée par Sieburth et al. (Fig. 2; 1978) et fractionne le phytoplancton en picophytoplancton (0,2 à 2  $\mu\text{m}$ ), nanophytoplancton (2 à 20  $\mu\text{m}$ ) et microphytoplancton (> 20  $\mu\text{m}$ ). Dans les océans (excepté les zones côtières), ce fractionnement en classes de taille permet de montrer une disparité dans la contribution à la production primaire : le picophytoplancton contribuant de 11% à 28%, le nanophytoplancton de 38% à 50% et le microphytoplancton de 26% à 55% (Uitz et al., 2010). Dans les écosystèmes côtiers, qui ne représentent que 7% de l'Océan global mais 30% de la production primaire des océans (Gattuso et al., 1998), ces proportions peuvent être extrêmement variables tels que montré en Manche-Mer du Nord par Barnes et al. (2014). Les contributions du micro-, nano- et picophytoplancton à la production primaire varient respectivement entre 20 et 80%, 13 et 52% et 4 et 56% (Barnes et al., 2014) dues à des changements de composition des communautés en réponses aux changements environnementaux, montrant ainsi l'intérêt d'étudier la totalité du spectre de taille du phytoplancton dans des conditions spatiales et temporelles variées.

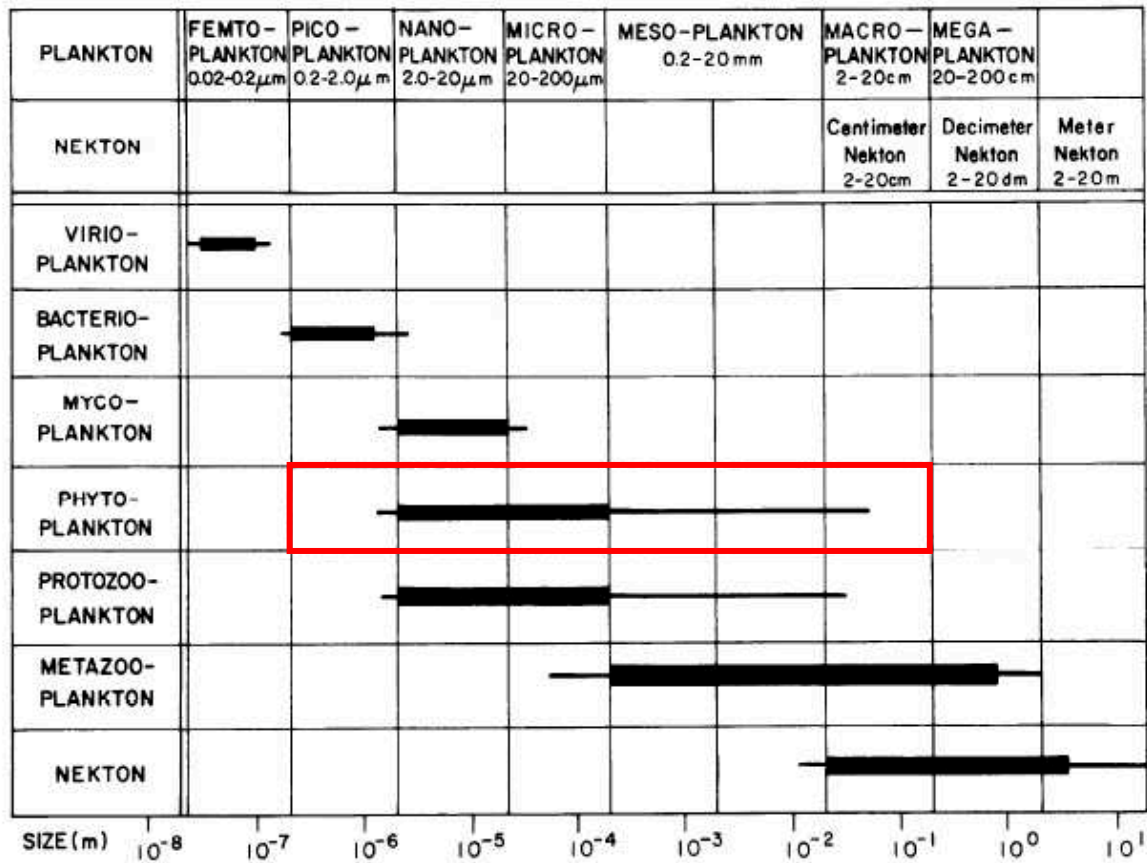


Figure 2 : Classes de taille chez le plancton. L’encadré rouge regroupe les classes de taille du phytoplancton. Tiré de (Sieburth et al., 1978)

En écologie, l’unité taxinomique de base est l’espèce. Ce niveau de considération est nécessaire pour comprendre les changements dans les réseaux trophiques ainsi que dans la production des écosystèmes, des changements de biomasse ou d’abondance d’une espèce pouvant avoir des répercussions sur tout l’écosystème. Néanmoins, les études portant sur la théorie des fonctions biodiversité-écosystème (BEF theory en anglais) font état qu’en plus de la taxinomie, il faut aussi considérer les traits des espèces (Flynn et al., 2009; Hooper et al., 2005). En effet, la diversité fonctionnelle (diversité intégrant les traits des espèces) permet de mieux définir la stabilité, la résilience et le fonctionnement des écosystèmes marins (Ptacnik et al., 2008). Par exemple, au sein d’un même groupe taxinomique, les espèces peuvent posséder des propriétés écologiques différentes alors que des espèces dans des groupes taxinomiques différents peuvent posséder des fonctions écologiques similaires (Salmaso et al., 2015). Il y a donc alors intérêt à regrouper les espèces partageant des traits communs en groupes

fonctionnels. L'obtention de ces groupes peut se faire en regroupant des organismes partageant des similarités écologiques, morphologiques ou combinant taxonomie, morphologie et fonctions écologiques réduisant ainsi la redondance écologique des espèces (Salmaso et al., 2015). En dehors de la classification sur la taille, la classification la plus connue et la plus utilisée en écologie du phytoplancton se base sur les traits d'histoire de vie, vis-à-vis des nutriments et de la turbulence (Fig. 3 ; séparant les stratégies *rudérales* et « *Kapazitätsgrenze* »). Elle est synthétisée dans le célèbre 'Mandala' (Margalef, 1978) puis reprise par Cullen et al. (2002). Cette classification est développée sur les phases végétatives du microphytoplancton et est donc continuellement remaniée pour ajouter une troisième dimension (i.e. modèle Competitive-Stress tolerant-Ruderal, Reynolds, 1997), prenant en compte le picophytoplancton (Wyatt, 2014), puis pour être appliquée aux algues nuisibles (Smayda and Reynolds, 2001) ou encore pour y inclure les *traits réponses* et les *traits effets* (Glibert, 2016) dont la définition sera donnée en partie 2.2 de ce chapitre.

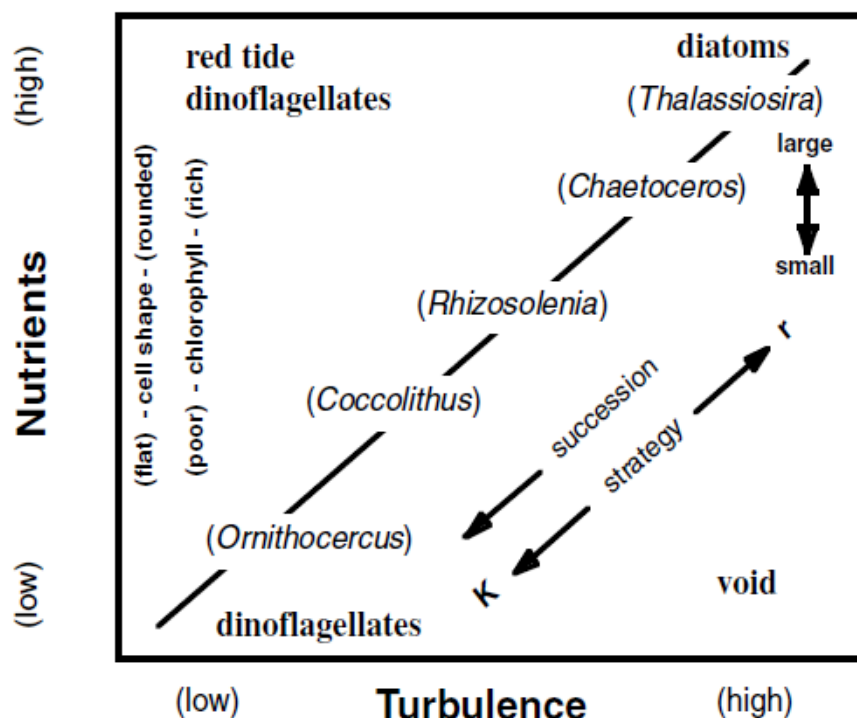


Figure 3 : Relation entre la turbulence, les nutriments et les caractéristiques des réseaux trophiques basés sur Margalef (1978) et modifié par ajout des formes de vie chez le phytoplancton (Cullen et al., 2002).

Ces classifications sur les traits d’histoire de vie sont très largement utilisées pour les études portant sur les cycles biogéochimiques. Néanmoins, d’autres classifications existent. Elles se basent sur les caractères morphologiques et physiologiques individuels des organismes (= traits fonctionnels). En écologie, l’utilisation de cette deuxième classification s’appuie sur le fait que la diversité fonctionnelle dérivée des traits fonctionnels semble mieux décrire le fonctionnement des écosystèmes et leurs services que la diversité taxonomique mais moins bien que la classification sur les traits d’histoire de vie (Cardinale et al., 2011; Naeem and Wright, 2003; Petchey and Gaston, 2006). Elle représente une sorte de compromis entre ces classifications. Par exemple, la classification sur les traits permet également, de réduire la redondance. En effet, un groupe fonctionnel de phytoplancton englobe les cellules ou colonies partageant une morphologie (Reynolds et al., 2002) et une physiologie similaire (Fontana et al., 2018). Il est également possible de regrouper certaines espèces qui étaient jusque-là inclassables tel que le genre *Phaeocystis* non-classifié dans les modèles r-K ou C-S-R (Brun et al., 2015; Reynolds et al., 2002) bien que des essais furent entrepris (Guiselin, 2010). Enfin, d’un point de vue mathématique, une classification basée sur les groupes fonctionnels détecte plus de variation statistique que les autres classifications puisqu’elle minimise la redondance (Fabbro and Duivenvoorden, 2000; Kruk, 2002). La suite de ce travail repose sur l’utilisation des traits morpho-physiologiques.

### 1.1.2. Les traits fonctionnels

Un trait (sensu stricto) est « un caractère morphologique, physiologique ou phénologique mesuré à l’échelle d’un individu, de la cellule à l’organisme entier, sans référence à l’environnement ni à tout autre niveau d’organisation » (Violle et al., 2007). D’un point de vue conceptuel, il est possible de distinguer deux sortes de traits. On trouve *des traits réponses*, les caractères qui influencent les performances d’un individu (= fitness) dans son environnement, et *des traits effets*, les caractères qui affectent la façon dont les organismes contribuent au fonctionnement des écosystèmes (Díaz and Cabido, 2001; Lavorel and Garnier, 2002). Ces deux catégories de traits sont soumises à l’hypothèse

de Baas-Becking qui stipule que « Everything is everywhere, but the environment selects ». D'un point de vue fonctionnel, cette hypothèse correspond à la théorie des filtres. Ces deux grandes catégories de traits reflètent les fonctions écologiques liées à l'acquisition des ressources (bottom-up) et à la prédation (top-down). Chaque trait est lié à une performance écologique (= fitness) qui s'établit le long d'un gradient de ressources dont les valeurs minimale et maximale définissent l'amplitude environnementale. Cette performance est mesurée par la survie, la croissance et la reproduction (Violle et al., 2007). Il s'agit de l'étendue des valeurs d'un paramètre environnemental pour laquelle on observe l'ensemble des valeurs possibles pour un trait. Pour une ressource donnée, il existe aussi une valeur préférentielle, celle où la performance du trait est optimale et donc donne la meilleure performance écologique (Fig. 4).

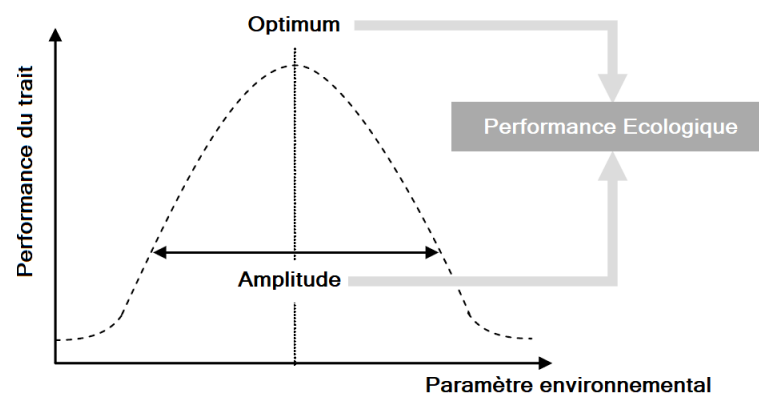


Figure 4 : Représentation graphique de la performance écologique. Elle correspond à l'optimum ou l'étendue de la distribution d'un des trois traits performance le long d'un gradient environnemental. Tiré de Violle et al (2007).

Chez le phytoplancton, ces traits réponses et traits effets sont catégorisés en quatre groupes ou selon les fonctions écologiques dans lesquelles ils sont impliqués (Fig. 5, Litchman & Klausmeier, 2008; Rosati et al., 2017; Weithoff & Beisner, 2019). On a les traits morphologiques, physiologiques, comportementaux et les traits d'histoire de vie. Chaque trait est capable d'affecter, positivement ou négativement, d'autres traits ce qui résulte en un compromis à définir entre les performances des traits et la performance écologique optimale. Dans le souci d'harmoniser les données entre les différents

capteurs et permettre une meilleure interopérabilité entre eux, le thésaurus PhytoTraits a été récemment créé, regroupant ainsi les traits sous une terminologie standard et valable pour le phytoplancton (Rosati et al., 2017).

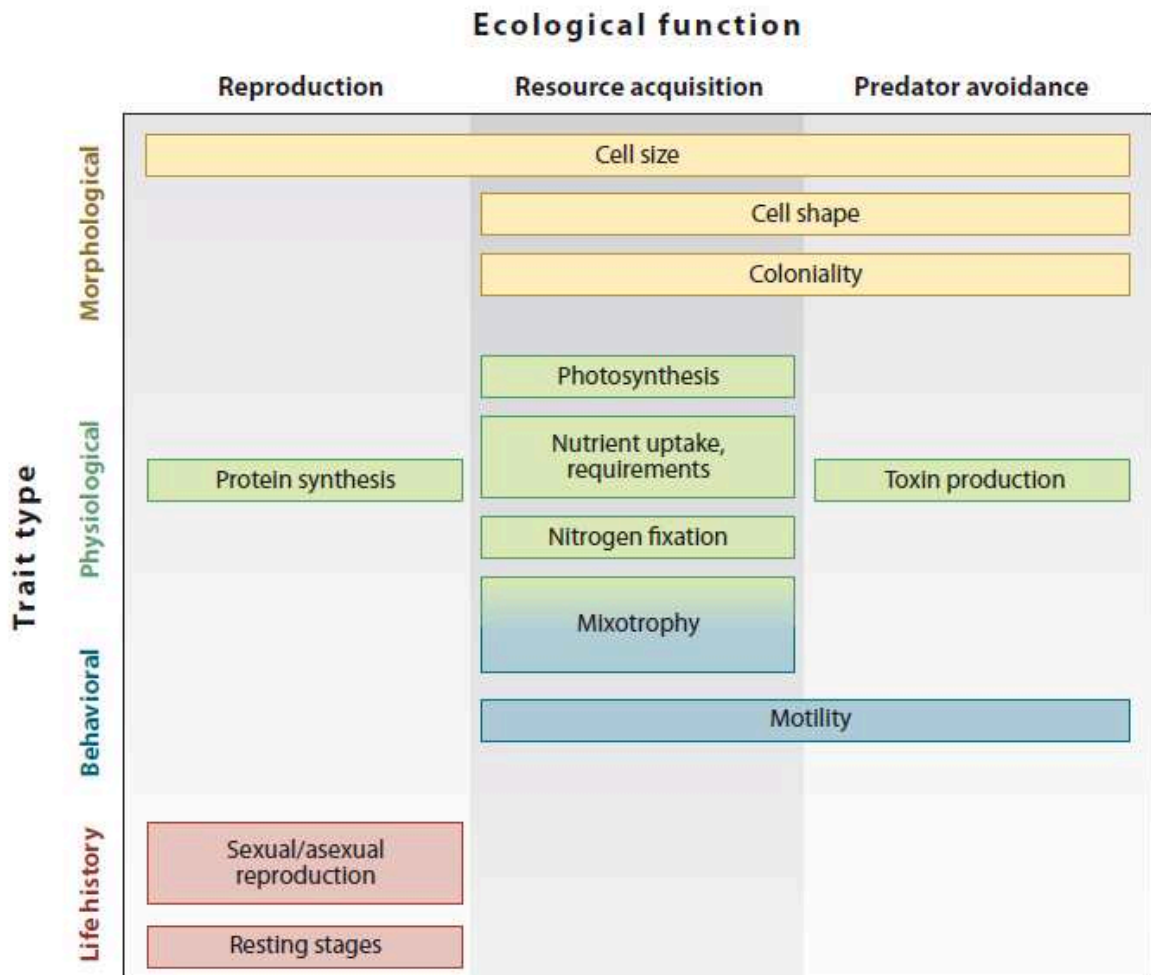


Figure 5 : Catégorisation des différents traits chez le phytoplancton en fonction du type de trait et de leur fonction écologique. D'après Litchman & Klausmeier (2008).

### Les traits morphologiques :

On y retrouve la taille, la forme, la colonialité, les structures internes et externes. De tous ces traits énumérés et pouvant être mesurés, la taille est définie comme le trait le plus important, étant même qualifiée de « master's trait » (Chisholm, 1992; Litchman et al., 2007; Marañón, 2015). La gamme de

taille s'étalant sur 9 ordres de grandeur, allant de 1 à 2000  $\mu\text{m}$  ESD (Fig. 6). La taille des organismes conditionne de nombreux paramètres physiologiques et écologiques puisque ces derniers suivent une loi de puissance fonction de la taille (e.g. Chisholm, 1992; Edwards, Thomas, Klausmeier, & Litchman, 2012; Finkel et al., 2010; Irwin & Finkel, 2017; Litchman, 2007; Litchman & Klausmeier, 2008; Marañón, 2015). On peut ainsi lister de manière non-exhaustive la respiration, la croissance, la sédimentation dans la colonne d'eau (liée à la loi de Stokes), la prédation, l'abondance maximale, l'absorption des nutriments et de la lumière (lié au « package effect » des pigments et détaillé dans la partie 3.1.3). Par exemple, la gamme de tailles très étendue du phytoplancton et l'importante diversité spécifique, également lors des différents stades de vie au sein d'une espèce, font qu'il existe de grandes variations dans le rapport surface/volume parfois au sein d'une même espèce (e.g. *Phaeocystis globosa*), ce qui amène à différentes capacités de croissance, certains groupes pouvant se diviser jusqu'à deux fois par jour (Alpine and Cloern, 1988). Ceci est en règle générale le cas avec les petites classes de taille qui sont de meilleurs compétiteurs vis-à-vis des ressources limitantes dans l'environnement (Litchman, 2007; Litchman et al., 2007; Tilman et al., 1982).

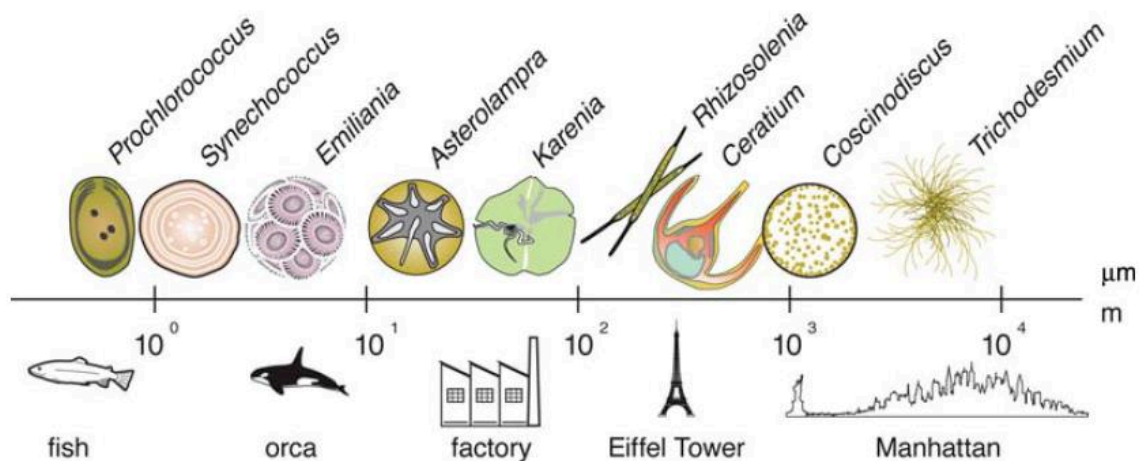


Figure 6 : Comparaison des gammes de taille chez le phytoplancton en relation avec des objets macroscopiques. Tiré de Finkel et al. (2010).



### Les traits physiologiques :

Les traits physiologiques sont essentiellement impliqués dans l'acquisition des ressources. On y retrouve par exemple, la taille, qui façonne directement d'autres traits, comme par exemple les besoins nutritionnels en silice pour les diatomées, les paramètres d'absorption des nutriments (établis via la courbe de Michaelis-Menten) ainsi que leur optimum. On trouve aussi les mécanismes liant la lumière et l'efficacité photosynthétique des micro-algues, liés à la composition pigmentaire des algues. Ces paramètres peuvent être définis via la courbe production - éclaircissement (courbe P-E) d'où on peut extraire l'intensité (ou énergie) de saturation lumineuse ( $E_k$ ), l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière ( $\alpha$ ) et obtenir le taux maximal de photosynthèse ( $P_{max}$ ). Ces traits sont plastiques et dépendent des conditions environnementales, aussi bien la lumière que des nutriments, mais également de l'histoire de vie des cellules et des cortèges pigmentaires des cellules dont les principaux pigments et leur spectre d'absorption de la lumière sont repris sur la figure 7. Ainsi, la composition pigmentaire engendre une réponse spécifique des groupes pigmentaires et permet une répartition le long de la colonne d'eau en l'absence de mélange vertical.

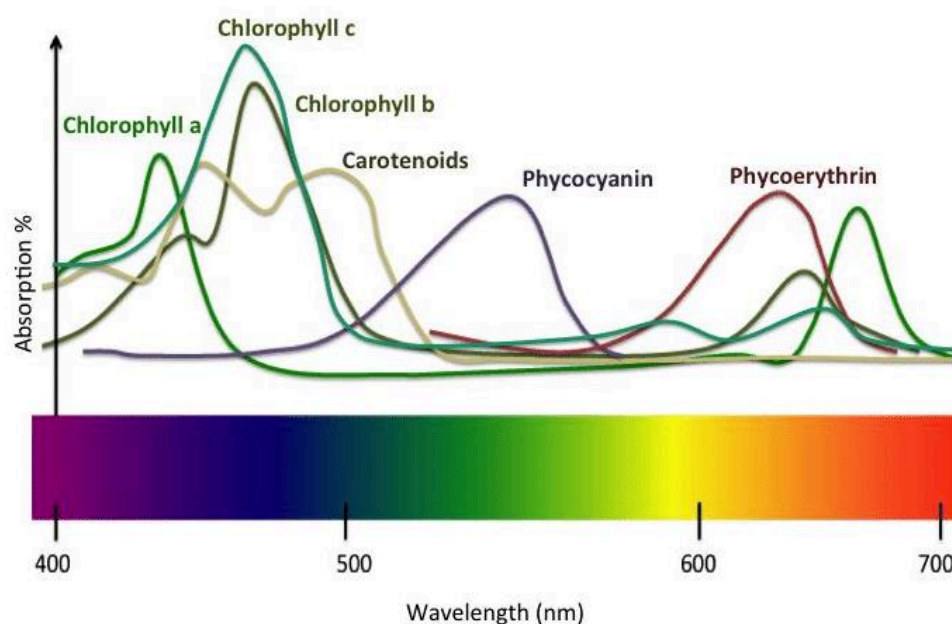


Figure 7 : Spectre d'absorption de la lumière chez les pigments photosynthétiques. Tiré de Yarish, Redmond, & Kim (2012).

**Les traits comportementaux :**

Ils sont impliqués dans la reproduction, l'agrégation (organismes coloniaux), la prédation (cas des mixotrophes) et les mécanismes d'échappement à la prédation. Ils concernent surtout la motilité et sont représentés par la présence/absence de flagelles, soies, haptonèmes, épines et aérotypes.

**Les traits d'histoire de vie :**

Ils comprennent les événements relatifs à la reproduction et aux stratégies démographiques comme le type de reproduction (sexuée/asexuée), les kystes, les stades du cycle de vie. Ces traits vont influencer la dispersion, les taux de croissance, taux de division ou reproduction.

Souvent les traits sont perçus comme fixes, alors qu'en réalité l'expression de certains traits dans le milieu est fortement dépendante des conditions environnementales locales et donc, ils présentent des variations spatiales et temporelles. Les traits comme par exemple la présence/absence de frustule siliceuse doivent toutefois être perçus comme statiques alors que l'épaisseur est variable, dépendant des besoins nutritionnels. Bien qu'expérimentalement étudiée sur quelques espèces ou sur des groupes taxinomiques ciblés, l'analyse des traits chez le phytoplancton souffre encore du manque d'expérimentations mono- et multicultures mais surtout d'analyses *in situ* sur l'entièreté des communautés phytoplanctoniques. En réalité, il s'agit de réussir à caractériser l'expression des traits *in situ* tout en gardant l'approche individuelle, puisque les traits se mesurent à l'échelle individuelle. Cette approche est relativement facile pour les traits morphologiques mais il est beaucoup plus difficile de mesurer les traits physiologiques à ce niveau, et très souvent, on les retrouve mesurés au niveau de la communauté. Récemment, les techniques d'analyses en « single-cell analysis » ont démontré leurs capacités à mesurer certains traits physiologiques (contenu interne en pigment via la fluorescence, répartition des pigments, taille des vacuoles) au niveau individuel (Fontana et al., 2018; Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013; Weithoff & Beisner, 2019).

Les différents types de traits vus précédemment permettent de regrouper les espèces ayant des valeurs de traits similaires et de définir des groupes fonctionnels chez le phytoplancton, (Litchman and Klausmeier, 2008) comme cela peut être fait chez les végétaux supérieurs et le zooplancton. Ce regroupement peut être réalisé par les méthodes statistiques de classification hiérarchique. Toutefois, il convient de déterminer les traits les plus pertinents pour obtenir une classification la plus robuste possible. D'un point de vue statistique, ceci revient à limiter la redondance entre les traits en étudiant leur colinéarité (Fontana et al., 2018). Les regroupements des espèces partageant des valeurs de trait identiques permettent alors de diminuer la redondance écologique, ce qui limite ainsi le chevauchement des différents groupes (Flynn et al., 2009) et permet alors de distinguer des niches écologiques différentes en fonction des groupes obtenus.

### 1.3. Les niches écologiques et le paradoxe du phytoplancton

#### 1.3.1. Les niches Grinnellienne et Eltonienne

Le concept de la niche écologique remonte au début du XXe siècle. Néanmoins, dès son apparition (Johnson, 1910), le concept de niche fait état de deux définitions bien distinctes (Leibold, 1995). La première définition, souvent attribuée, à tort, à Grinnell (1917), est évoquée pour la première fois par Rowsell Hill Johnson (1910). La niche est alors la place qu'occupe une espèce dans son environnement (Johnson, 1910). La raison pour laquelle cette définition est attribuée à Grinnell provient du fait qu'il est le premier à intégrer ce concept dans la recherche scientifique (Grinnell, 1917). Comme décrit par Whittaker et al. (1973), la niche Grinnellienne représente donc l'habitat d'une espèce, conditionné par les ressources vitales nécessaire à cette espèce. Dans cette vision de la niche, les ressources vitales à l'espèce vont alors être la seule limite à son expansion, suivant alors les lois de la population de Malthus. Une seconde définition du concept de niche est à attribuer à Elton (1927). La niche correspond ici, à la position qu'occupe l'espèce dans son environnement (biotique et abiotique, fig. 8). Ici, la niche est une relation fonctionnelle de l'espèce sur son environnement. Néanmoins, le concept

de niche est en réalité une dualité entre performance de l'espèce dans l'environnement (niche Grinnellienne) et impact de l'espèce sur l'environnement (niche Eltonienne).

### 1.3.2. La niche Hutchinsonienne

A la fin des années 1950, Hutchinson théorise le concept de niche comme une caractéristique intrinsèque à l'espèce. La niche est définie comme étant *un volume à n-dimensions, chaque dimension représentant un paramètre biotique ou abiotique. Au sein de cet hypervolume, chaque point correspond à un état de l'environnement qui permettrait à une espèce d'exister indéfiniment (Hutchinson, 1957)*. Cette région du volume correspondant à l'ensemble des conditions environnementales permettant à une espèce donnée de se développer est appelée niche fondamentale (Fig. 8). Néanmoins, la définition de la niche selon Hutchinson repose sur la coexistence des espèces. Ainsi selon la définition d'Hutchinson, la séparation des niches entre espèces repose le principe de Gause (Gause, 1934) qui stipule que deux espèces ayant des exigences écologiques identiques ou simplement voisines ne peuvent co-exister indéfiniment dans le même milieu. Ceci a donc pour conséquence que chaque espèce ne peut pas occuper l'entièreté de sa niche fondamentale (Pulliam, 2000). La niche réalisée des espèces sera donc plus restreinte à cause des facteurs abiotiques ou des interactions biotiques et forme alors la niche réalisée (Fig. 8). La niche réalisée représente alors la niche réelle d'une espèce. Le principe de Gause a été modélisé mathématiquement pour des modèles simples avec une ressource (Freedman and Waltman, 1977; Volterra, 1928). Des modèles plus complexes, avec plusieurs espèces et plusieurs ressources, stipulent également que le nombre d'espèces co-existantes à l'équilibre ne peut pas dépasser le nombre de facteurs limitants (e.g. Sommer et al., 1986). Les travaux réalisés au cours de cette thèse utilisent la définition de la niche écologique selon Hutchinson, avec plusieurs ressources.

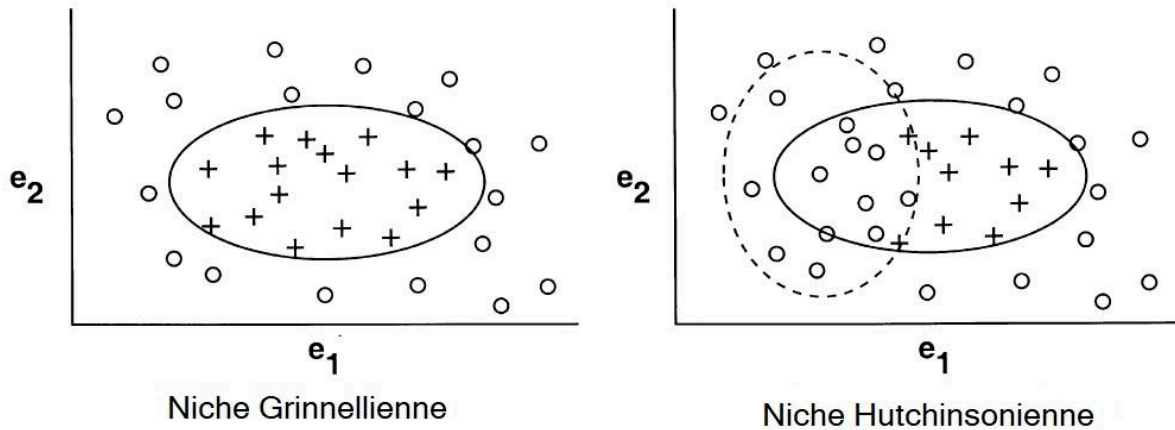


Figure 8 : Représentation entre la niche et la distribution des espèces. Chaque ellipse représente la niche pour deux facteurs environnementaux considérés ( $e_1$  et  $e_2$ ). Selon la niche Hutchinsonienne, une espèce est absente de la portion de sa niche partagée avec un compétiteur dominant (ligne en pointillés représente la niche d'un compétiteur dominant). Les « plus » représentent la présence d'une espèce dans un patch de l'habitat le long des gradients environnementaux  $e_1$  et  $e_2$ . Les « ronds » représentent l'absence d'une espèce dans un patch de l'habitat le long des gradients environnementaux  $e_1$  et  $e_2$ . Tiré de Pulliam (2000)

### 1.3.3. Le paradoxe du plancton

Dès lors que le concept de la niche écologique a été établi, il a été largement admis que tous les organismes appartenant aux différents règnes du vivant sont soumis au concept de niche. Néanmoins, Hutchinson a observé que dans le cas du phytoplancton, plusieurs espèces étaient capables de coexister dans le milieu (Hutchinson, 1961). Cette observation va à l'encontre de l'exclusion compétitive et se nomme « le paradoxe du plancton » (Hutchinson, 1961). Il propose alors l'hypothèse que l'équilibre dans le milieu n'est jamais atteint car l'environnement (facteurs abiotiques et biotiques) subira des changements avant même de pouvoir atteindre l'équilibre. Par conséquent, la compétition exclusive n'atteint jamais son paroxysme et les espèces peuvent co-exister. Plusieurs hypothèses sont alors proposées depuis soixante ans en vue de résoudre le paradoxe du plancton : l'influence des forçages externes environnementaux, les cycles biologiques et les interactions inter-spécifiques (Roy and Chattopadhyay, 2007). La plupart d'entre elles présentent une dynamique spatiale et/ou temporelle.

## 2. La variabilité spatio-temporelle

### 2.1. Les facteurs régissant la distribution spatiale et temporelle

De par ses caractéristiques, le phytoplancton a besoin de CO<sub>2</sub>, de lumière et de nutriments pour assurer son métabolisme, lui-même étant régulé par la température, la profondeur de la couche de mélange, le pH, et le vent (Fig. 9). Ces éléments présentent une dynamique spatiale et également temporelle à laquelle le phytoplancton répond. La variabilité a lieu à plusieurs échelles allant des petites échelles (variations au cours de la journée et de l'ordre de quelques cm ou m) jusqu'à de grandes échelles (variations interannuelles et latitudinales). Cette partie a pour objectif de décrire les paramètres influençant la variabilité spatio-temporelle du phytoplancton.

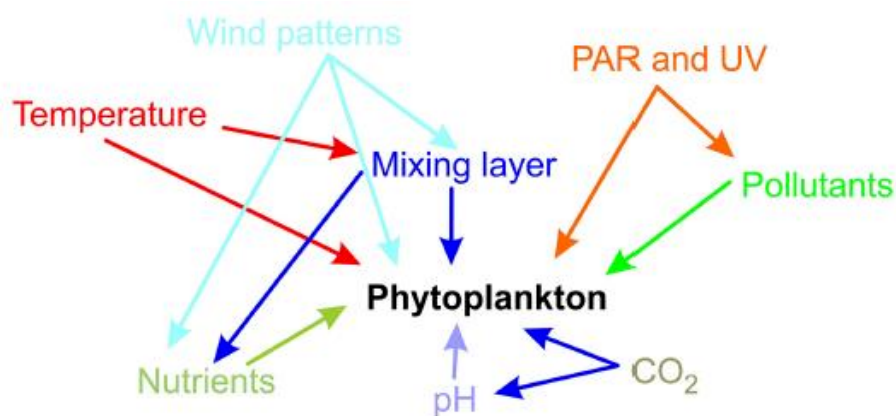


Figure 9 : Interactions entre les facteurs externes affectant le phytoplancton. D'après Häder et Gao (2015).

#### 2.3.1. La lumière

La lumière est essentielle pour tous les organismes photo-autotrophes et donc, pour le phytoplancton. Elle permet la photosynthèse des composants cellulaires en entrant dans les réactions avec les nutriments. Elle est hétérogène dans l'espace et dans le temps, dans la composante verticale des masses d'eaux mais aussi dans la composante horizontale, aussi bien en termes de qualité que de quantité. A large échelle mais aussi à échelle régionale et locale, l'hétérogénéité de la lumière est marquée par les composantes atmosphériques comme la couverture nuageuse et les gaz à effets de serre (Kirk, 2011). Dans la colonne d'eau, les propriétés optiques de l'eau vont être influencées par les particules en

suspension, détritiques ou vivantes, et par les composés dissous (notamment le Colored Dissolved Organic Matter ou CDOM) soit en absorbant la lumière, soit en la déviant (Yentsch, 1962). Le spectre de la lumière utilisé pour la photosynthèse est compris entre 400 nm et 700 nm et est défini comme le PAR (i.e. Photosynthetic Active/Available Radiation). C'est cette gamme de longueur d'onde qui peut être absorbée par les pigments photosynthétiques. La photosynthèse est effectuée dans cette couche limitée par le seuil de 1% de la lumière incidente et correspondant à la couche euphotique (Kirk, 2011). L'hétérogénéité verticale de la lumière est marquée par l'extinction successive des grandes longueurs d'ondes (rouge) aux petites longueurs d'ondes (bleue) suivant l'enfoncement dans la colonne d'eau. Ainsi, elle participe à la distribution des groupes phytoplanctoniques le long de la colonne d'eau, qui, en fonction de leur cortège pigmentaire vont répondre à l'extinction de la lumière mais aussi à la quantité de lumière à une profondeur donnée. Néanmoins, la présence de cellules phytoplanctoniques dans la colonne d'eau peut entraîner un auto-ombrage, appelé « package effect » (Kirk, 2011). Il dépend de la taille des cellules (comme vu précédemment) et de la distribution des pigments au sein des cellules mais également de l'intensité du rayonnement lumineux. Il sera particulièrement important en présence de nombreuses cellules de grande taille ou à fort contenu pigmentaire comme les diatomées ou à de faibles éclaircissements lorsque la photoacclimation entraîne des modifications structurelles des cellules (densité de la membrane des thylakoïdes, changement du volume des cellules, nombre de plastes, arrangement des plastes ; Berner et al., 1989; Falkowski and Julie, 1991).

### 2.3.2. Nutriments

Pour se développer et assurer des processus métaboliques, le phytoplancton requiert des macro- et des micro-nutriments. On peut ainsi énumérer des éléments clefs, indispensable aux cellules pour leur bon fonctionnement : le carbone (sous forme de bicarbonate), l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore (phosphate), le potassium, l'iode, l'azote (sous forme de nitrate, nitrite, ammonium), la silice (sous forme de silicates, uniquement chez les diatomées et les silicoflagellés et en petites quantités chez

*Synechococcus*), le manganèse, le calcium, le fer, le cuivre, le zinc et le molybdène. La cinétique de l'assimilation des nutriments par les particules suit une réponse de type Michaëlis-Menten, avec une augmentation rapide, ralentissant progressivement au fur et à mesure que les concentrations externes augmentent, pour atteindre finalement un plateau. Ces nutriments présentent une dynamique spatio-temporelle régie fortement par les cycles saisonniers. La distribution spatiale des nutriments est très hétérogène. Par exemple, les estuaires et les côtes sont souvent perçus comme des zones riches en sels nutritifs alors que les eaux du large sont beaucoup plus pauvres. Néanmoins, ces zones riches ou pauvres présentent également une hétérogénéité dans les concentrations, dépendant de la quantité de nutriments apportés par les fleuves, de l'éloignement aux côtes mais aussi de l'emprise spatiale des panaches estuariens. Les fronts tidaux, ainsi que les marges continentales peuvent parfois être associés à des remontées d'eaux plus froides (= upwelling), enrichies en sels nutritifs. En plus de la dynamique spatiale, il existe une dynamique temporelle allant de l'échelle infra-journalière à l'échelle interannuelle. Les plus fortes variations temporelles étant surtout liées aux saisons avec les modifications du débit des fleuves par l'apport en eaux douces près des côtes. Dans certains endroits, une stratification thermique peut se mettre en place et empêche la circulation des nutriments. La circulation des nutriments est rétablie lors de perturbations physiques (e.g. coup de vent). Dans les écosystèmes productifs, tels que les zones côtières, les stocks de nutriments (principalement azote, phosphore, silicate et fer) se reconstituent en fin d'automne et en hiver grâce aux apports éoliens et au drainage des bassins continentaux. Ils atteignent leur maximum en fin d'hiver-début de printemps. Progressivement, l'augmentation de la quantité et l'augmentation de la qualité de la lumière couplées aux concentrations élevées en nutriments permettront l'établissement d'efflorescences phytoplanctoniques (= blooms). Ce sont ces blooms qui seront responsables de l'épuisement des stocks de sels nutritifs.



### 2.3.3. Température

La température est le paramètre conditionnant le métabolisme de tous les organismes sur Terre. Dans les mers et océans, elle va présenter une large hétérogénéité spatiale (par exemple, gradient latitudinal à large échelle et un gradient côte-large à échelle plus locale) et temporelle (réchauffement et refroidissement des masses d'eaux au cours de la journée, réchauffement des masses superficielles en milieu stratifié et refroidissement lors de perturbation de la colonne d'eau, saisonnalité). La température a un double effet chez les organismes planctoniques. D'abord un effet direct, en influençant la photosynthèse, la respiration, la croissance. La réponse de ces processus peut être modélisée par la loi de Van't Hoff (simplifiée en loi du  $Q_{10}$ ) qui stipule que la vitesse des réactions biochimiques est doublée tous les 10°C supplémentaires. Dans un second temps, la température a aussi un effet indirect sur la succession de groupes phytoplanctoniques dominants notamment en altérant la stabilité de la colonne d'eau, en plus d'autres forçages (vents, courants de marée, marées, apports estuariens) et impactant le métabolisme des prédateurs et recycleurs des nutriments. Chaque espèce possède une tolérance à la température définie avec des optima différents selon les espèces ou groupes d'espèces. Néanmoins, les différents processus métaboliques présents chez une espèce peuvent présenter des optima différents. La plupart des traits suivant une relation allométrique, la température va alors façonner d'autres traits morphologiques et physiologiques. Il s'agit d'une caractéristique capitale dans le futur de l'écologie dans le contexte de réchauffement global pouvant modifier la distribution des groupes fonctionnels phytoplanctoniques, altérant alors la diversité (Häder and Gao, 2015).

La distribution des espèces chez le phytoplancton résulte de l'ensemble de ces facteurs. Ainsi, des compromis apparaissent avec l'impact des interactions interspécifiques et intraspécifiques générant une distribution spatiale et/ou temporelle très hétérogène.

## 2.2.L'importance des échelles d'études spatiale et/ou temporelle dans l'étude du phytoplancton

En règle générale, la distribution spatiale des organismes est déterminée par l'interaction entre processus biologiques et structures et processus physiques (McManus & Woodson, 2012 Fig. 10). En milieu marin, la balance entre ces deux mécanismes étant liée à la capacité des organismes à se mouvoir dans leur milieu. Chez le phytoplancton, il y a un déséquilibre entre les processus physiques qui sont plus importants que les processus biologiques dans la capacité de déplacement. Toutefois, les champs d'études en écologie du phytoplancton sont vastes, allant des interactions à la microéchelle (< 1 m) jusqu'à la macroéchelle (> 100 km) en passant par la sub-mésoséchelle (1 à 10 km) et la mésoséchelle (10 à 100 km). Il s'en trouve alors que la dynamique observée à une échelle donnée est liée à la dynamique biologique (individuelle à la communauté) et/ou physique (microéchelle à macroéchelle ; détaillée dans le paragraphe suivant) qui plus est, est intimement influencée par les échelles sus et sous-jacentes (Fig. 10. Prairie, Sutherland, Nickols, & Kaltenberg, 2012).

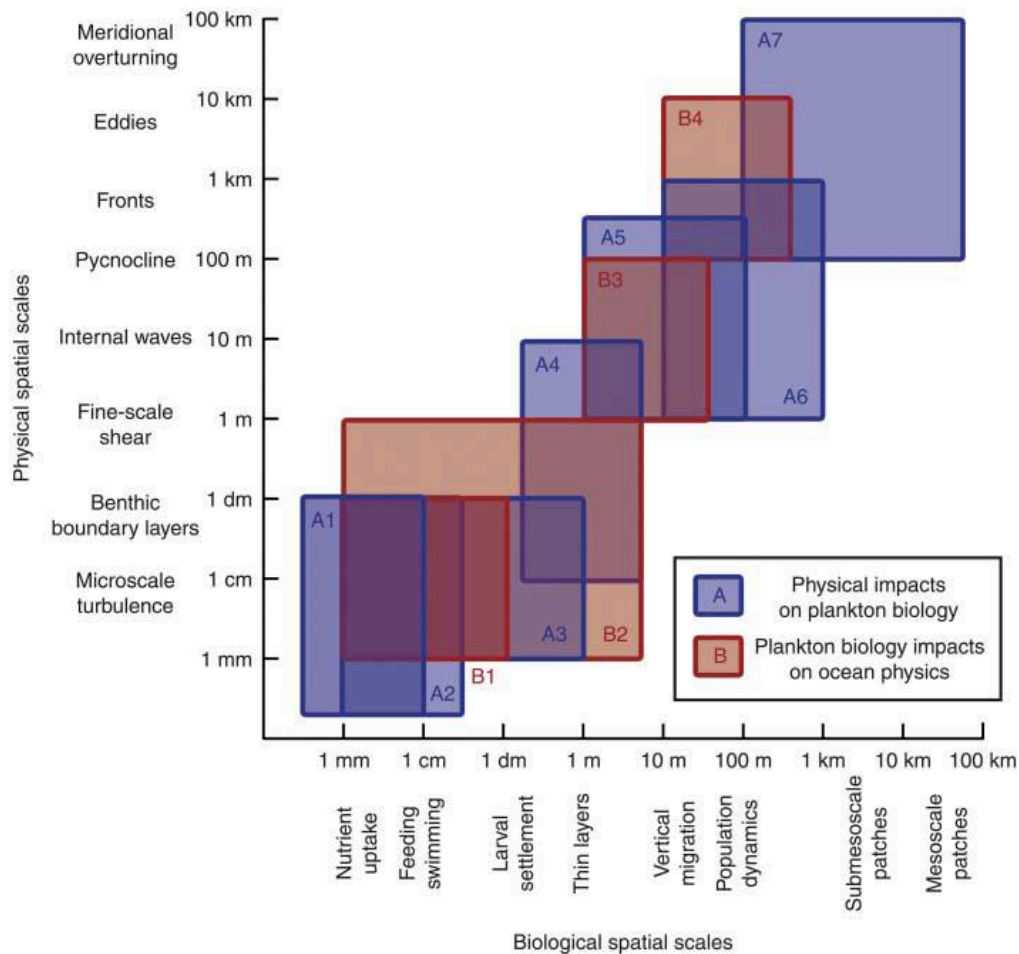


Figure 10 : Echelles spatiales d'interactions entre les processus biologiques et physiques en écologie du plancton. Les rectangles bleus correspondent aux processus physiques. Les rectangles rouges correspondent aux processus biologiques. Tiré de Prairie et al. (2012)

A microéchelle (< 1 m), le phytoplancton réalise l'absorption de nutriments via la diffusion. Lorsque ces nutriments sont en quantité suffisante voire en excès dans le milieu et que la qualité et la quantité de lumière s'accroissent, le phytoplancton y répond favorablement et peut s'accumuler. Il y a alors une augmentation de la biomasse et des abondances allant jusqu'à former des efflorescences ou « blooms ». Ces blooms apparaissent alors à la sub-mésoéchelle (1 à 10 km, heure à journée) et mésoéchelle (10 à 100 km, semaine à mois) et sont impliqués à plus large échelle dans la biogéographie des communautés phytoplanctoniques. En outre, les phénomènes physiques à la microéchelle (turbulence) vont modifier la distribution spatiale du phytoplancton en entraînant la formation de patches à petites échelles (micro-échelle) et influence également les processus biologiques inter- et

intraspécifique (compétition, broutage). A sub-mésoéchelle et mésoéchelle, les flux côtiers, fronts et les tourbillons contribuent à disperser ou concentrer les nutriments et/ou le phytoplancton ce qui entraîne la formation de patches de taille variable suivant la puissance des phénomènes (Prairie et al., 2012). A proximité des côtes, les flux côtiers formés par la dérive littorale et les tourbillons côtiers, la topographie, la marée et les vents vont participer au transport des nutriments et du phytoplancton le long des côtes (Prairie et al., 2012). Ils vont jouer un rôle prépondérant dans la biogéochimie. De plus, les cellules de Langmuir sont gouvernées par des paramètres physiques à plus large échelle ainsi que le vent et influencent la dynamique trophique globale alors que ces mêmes tourbillons sont affectés par les agrégations de plancton à petite échelle (ils affectent les taux de rencontre). Quant aux fronts, ils peuvent agir comme des zones de convergence ou divergence, accumulant ou dispersant les nutriments et les micro-organismes de part et d'autre de ce front (Franks and Walstad, 1997). Au niveau vertical, ils peuvent agir comme des barrières au mélange vertical et contribuent à concentrer les nutriments en surface (comme en Manche occidentale), mais peuvent créer aussi un mélange en présence d'upwelling ou de downwelling. En créant des patches de nutriments, en surface et dans la colonne d'eau, les phénomènes physiques agrandissent la taille des niches (d'Ovidio et al., 2010; Pulliam, 2000). Ainsi en fonction des échelles spatiales et temporelles à caractériser, il convient d'adapter l'échelle d'étude à la problématique en question et à chaque problématique la stratégie d'échantillonnage adéquate pour y répondre (Fig. 11). Les phénomènes étudiés lors de cette thèse de doctorat sont les blooms phytoplanctoniques, les fronts et la stratification à sub-mésoéchelle, c'est pourquoi nous nous intéresserons particulièrement à observer la dynamique du phytoplancton à sub-mésoéchelle et à la mésoéchelle.

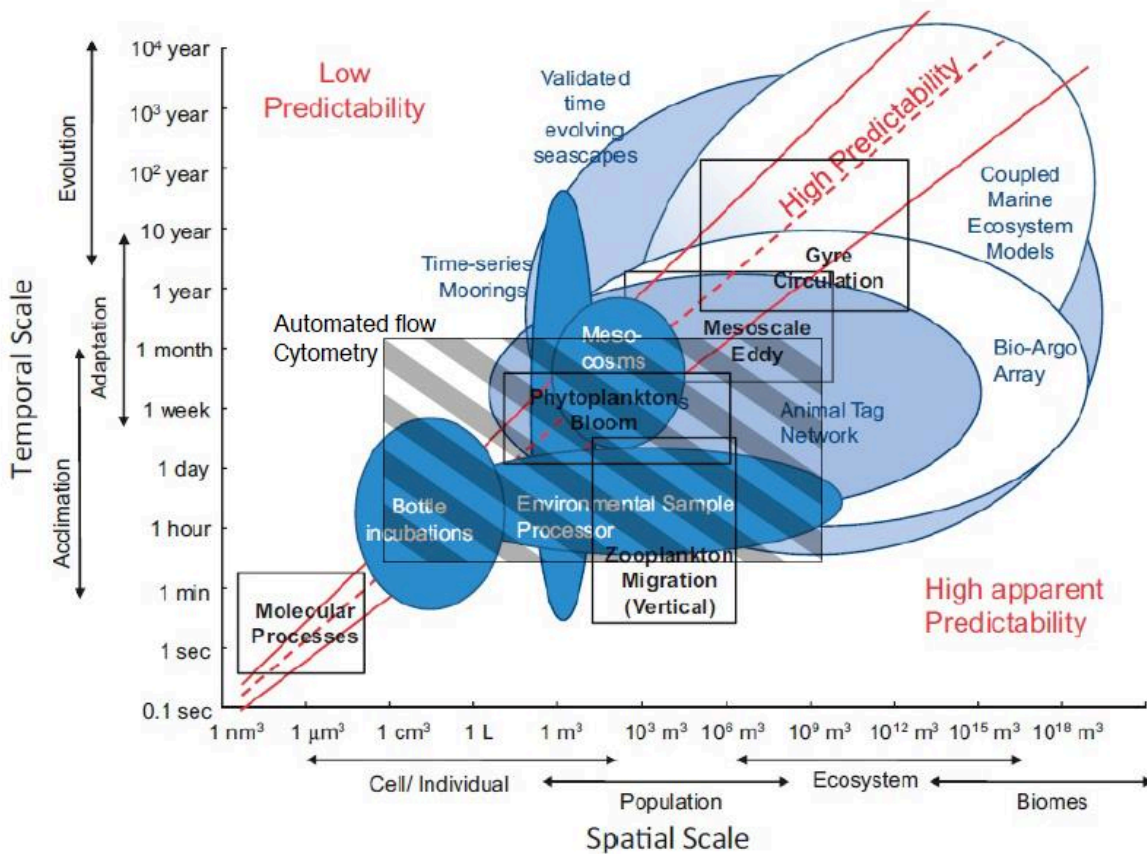


Figure 11 : Diagramme de Stommel des échelles spatiales et temporelles des phénomènes biophysiques ainsi que les moyens d'études. Le gradient de transparence fait référence au niveau de complexité écologique que fournissent les moyens d'échantillonnage. Tiré et modifié de Kavanaugh et al. (2016). La technique utilisée dans cette thèse est représentée par le rectangle hachuré.

### 3. Objectifs et cadre de la thèse

Cette thèse de doctorat a pour objectif global l'étude de la variation spatiale et temporelle à la sub-mésoéchelle des communautés phytoplanctoniques marines côtières à partir de leurs abondances et leurs caractéristiques optiques.

La plupart des études sur le phytoplancton sont réalisées à partir d'échantillonnages discrets et des techniques d'analyses discriminant les groupes et espèces phytoplanctoniques à partir de critères morphologiques (e.g. comme en microscopie à inversion ; Utermöhl, 1958) et/ou basés sur la composition pigmentaire (e.g. HLPC) et la chémotaxonomie (Mackey et al., 1996). Les résultats sont utilisés pour déterminer la diversité, l'abondance et la biomasse. Parmi ces techniques, la microscopie

permet une excellente identification taxonomique au niveau individuel et pour des particules dont la taille est supérieure à 10  $\mu\text{m}$  (Rutten et al., 2005), correspondant au microphytoplancton et une partie du nanophytoplancton. Cependant, cette technique requiert un haut niveau de qualification, peut s'avérer fastidieuse et peut être destructrice dans le cas d'échantillons fixés (Thyssen et al., 2008b). Par conséquent, elle n'est pas adaptée pour un suivi de la totalité du phytoplancton à haute résolution spatiale et temporelle (Cullen et al., 1997; Millie et al., 1997; Richardson and Pinckney, 2004; Schofield et al., 1999). C'est également le cas pour les analyses pigmentaires (Stoń et al., 2002) qui, même si elles considèrent la totalité du spectre de taille du phytoplancton, sont difficilement applicables à très haute fréquence et ne permettent pas d'obtenir un haut niveau de discrimination du phytoplancton. Il est toutefois possible d'obtenir une approche fonctionnelle en se basant sur les groupes pigmentaires et la chémotaxonomie (Mackey et al., 1996; Muylaert et al., 2006).

Connaissant le cycle de vie pouvant être rapide chez le phytoplancton (doublement jusqu'à 2 à 5 fois par jour chez certaines diatomées ; Furnas, 1991), il y a un besoin d'adapter la fréquence d'échantillonnage à la problématique des études. Bien que les techniques de référence (citées ci-dessus) présentent de solides avantages, elles ne sont pas adaptées à un échantillonnage à haute fréquence ni à résolution spatiale fine. Dans ce contexte, plusieurs capteurs innovants peuvent être utilisés *in vivo*. La fluorimétrie *in vivo* et les mesures satellitaires sont capables d'obtenir une résolution spatiale et temporelle plus fine et couvrir une plus large zone concernant la distribution de la chlorophylle *a*. Malheureusement, ces deux techniques ne renvoient le plus souvent qu'à une estimation globale de la chlorophylle *a*. Cette estimation de la chlorophylle *a* est toutefois influencée par différents paramètres : la physiologie des cellules, les conditions lumineuses, les propriétés optiques du dissous et du particulaire et les paramètres physico-chimiques. Depuis environ 15 ans maintenant, de nombreuses améliorations ont vu le jour et ont permis d'utiliser des techniques *in vivo* *in situ* et *ex situ* pour la caractérisation à l'échelle individuelle. C'est notamment le cas de la cytométrie

en flux qui a pu être automatisée et adaptée à l'ensemble du spectre de tailles du phytoplancton, la fluorimétrie multi-spectrale et aussi de certains systèmes d'acquisition/analyse automatisée d'images.

De précédents travaux ont utilisé la cytométrie en flux automatisée de type « pulse shape-recording » (souvent appelée « scanning flow cytometry ») dans différents écosystèmes, oligotrophes à eutrophes. Ces études montrent, par exemple, la distribution spatio-temporelle du phytoplancton lors de campagnes dans des écosystèmes variés, oligotrophes (Hamdi et al., 2013), mésotrophes et eutrophes (Bonato et al., 2016, 2015). Cet instrument, également adapté aux suivis eulériens sur des plateformes ou bouées (Thyssen et al., 2014a) a servi à caractériser des blooms d'algues nuisibles comme *Phaeocystis globosa* (Bonato et al., 2015; Guiselin, 2010) ou de dinoflagellés (Dugenne et al., 2014).

Le travail effectué ici, s'inscrit dans la poursuite de ces travaux. Néanmoins, dans cette thèse, en plus d'étudier la distribution spatio-temporelle à sub-mésoéchelle des communautés phytoplanctoniques et de leurs paramètres intrinsèques, il s'agit d'expliquer quels sont les mécanismes environnementaux, propres à chaque zone d'étude, qui peuvent être responsables d'une structuration des communautés phytoplanctoniques à sub-mésoéchelle (Fig. 12). L'intégration de la méthode vis-à-vis des échelles spatiales et temporelles est visualisable sur la figure 11. La cytométrie en flux automatisée se pose alors comme une méthode adéquate pour répondre à la problématique des échelles fines rencontrées au cours de cette étude (sub-mésoéchelle horizontale, 1 - 10 km et la fine échelle verticale, résolution spatiale à 5 m) et pour étudier les objectifs définis ci-dessous.

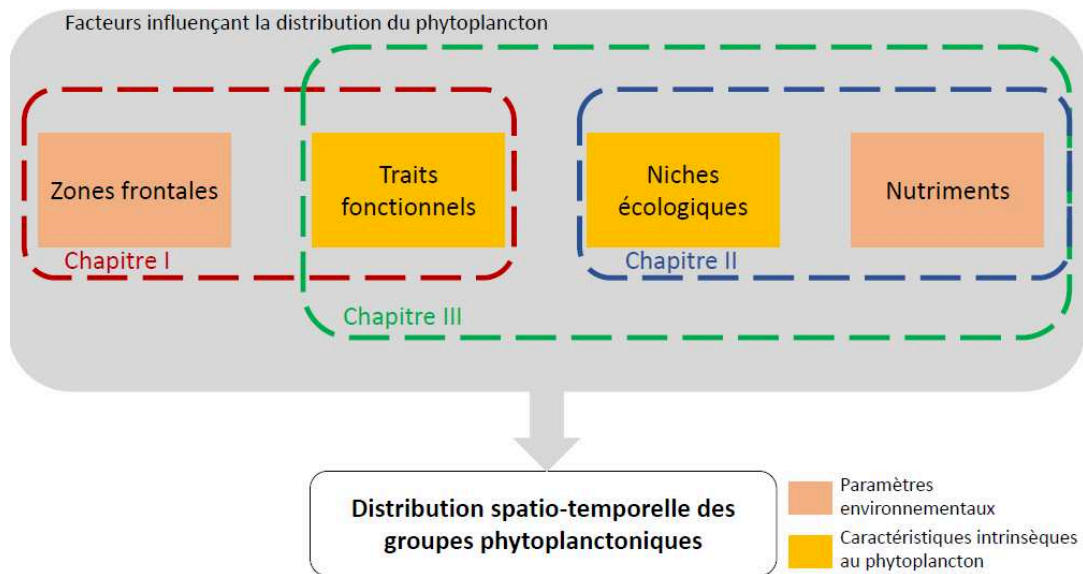


Figure 12 : Schéma conceptuel des axes de la thèse pour répondre à la problématique de la distribution spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques en systèmes côtiers à sub-mésoséchelle.

Pour acquérir une vision la plus complète possible des écosystèmes côtiers tempérés, ce travail s'appuie sur des sites de mers épicontinentales et intérieures différentes, de par leurs conditions hydrologiques (zones frontales, importance des apports fluviaux, stratification thermique et haline), la composition de leurs communautés phytoplanctoniques lors de blooms phytoplanctoniques et ce, à des périodes différentes et contrastées entre les sites. Ce travail s'inscrit dans la continuité du projet INTERREG IVA « 2 mers » DYMAPHY (2010-2014) et a bénéficié du support de projets régionaux (CPER MARCO), nationaux (convention MTES-CNRS pour la mise en place de la DCSMM, l'évaluation écologique et le programme de surveillance des habitats pélagiques) et européens (projet H2020 JERICO-NEXT) pour le déploiement d'un cytomètre automatisé lors de campagnes océanographiques. Ces déploiements participent à l'amélioration des procédures opérationnelles et des performances des techniques automatisées dans l'observation des écosystèmes côtiers qui s'avèrent être nécessaires dans le cadre de JERICO-RI pour la mise en place d'une infrastructure européenne jointe d'observatoires côtiers incluant à la fois les observatoires à basse et haute résolution spatiale et temporelle.



Ce travail sur la distribution spatio-temporelle des groupes fonctionnels phytoplanctoniques et de leurs caractéristiques à partir d'une approche automatisée s'articule autour de trois problématiques :

- 1) Quelle est la structure des assemblages phytoplanctoniques à fine échelle ainsi que de leurs propriétés optiques dans les dimensions horizontales et verticales ?
- 2) Quelles est la pertinence d'utiliser une classification du phytoplancton basée sur les propriétés optiques et qui définissent ainsi des traits fonctionnels ?
- 3) Quels paramètres influencent la variabilité des assemblages phytoplanctoniques à fine échelle ?

Ce travail se décompose alors en trois axes permettant de répondre à ces problématiques, à savoir :

Le premier axe (Chapitre 3) porte sur la compréhension de la distribution des communautés phytoplanctoniques et de leurs traits en Manche occidentale et Manche centrale lors de la période de transition été-automne. La zone d'étude est caractérisée par un front tidal présentant une dynamique à la fois spatiale et temporelle et des Regions of Freshwater Influence (ROFIs). La spatialisation du phytoplancton autour des zones frontales en Manche est étudiée à sub-mésoséchelle.

Le deuxième axe (Chapitre 4) porte sur la spatialisation des groupes fonctionnels phytoplanctoniques et leur ségrégation spatiale en Manche orientale et sud de la Mer du Nord au cours du développement du bloom printanier (diatomées et de l'haptophyte *Phaeocystis globosa*) à l'aide du calcul de la diversité  $\beta$  locale et à la définition de leurs niches écologiques. Il s'agit de mettre en évidence les changements de communautés à haute résolution spatiale et de déterminer les groupes fonctionnels responsables de ces changements et de relier ces observations via les données environnementales acquises à haute fréquence ainsi que les paramètres de niches de chaque groupe fonctionnel phytoplanctonique.

Le troisième axe (Chapitre 5) est une étude portant sur la variabilité, à la sub-mésoséchelle, du phytoplancton en Mer Baltique et dans les détroits scandinaves lors de la période estivale caractérisée

par des blooms de cyanobactéries filamenteuses (Mer Baltique) et de dinoflagellés (détroits scandinaves), ceci dans un environnement stratifié et de faible salinité. Il s'agit de caractériser la répartition horizontale et verticale, d'analyser et de modéliser la distribution verticale et les abondances par les paramètres environnementaux (sels nutritifs) ainsi que les niches écologiques et les traits fonctionnels.

Enfin, les résultats obtenus sont repris et discutés dans un sixième chapitre. Un point est apporté également aux aspects n'ayant pas pu être développés dans ce travail et permettent de dégager des perspectives pour les futurs travaux dans ce domaine.



# Chapitre II : Matériels et Méthodes

## 1. Les sites d'étude

La Manche, la Mer du Nord et la Mer Baltique sont des mers épicontinentales situées en Europe, sous influence des eaux atlantiques et des apports continentaux continus par le drainage des bassins versant par les fleuves. Elles possèdent toutes à un moment donné de l'année une zone frontale à leur entrée qu'elle soit permanente (front du Skagerrak) ou temporaire (front d'Ouessant). Elles sont toutes soumises aux activités anthropiques qui ont largement contribué à enrichir les zones étudiées en nutriments ce qui a entraîné une eutrophisation de la Mer Baltique et des parties orientales de la Manche orientale et du sud de la Mer du Nord. Ces dernières caractéristiques font que la Mer Baltique et la partie orientale de la Manche orientale et du sud de la Mer du Nord soient reconnues comme vulnérables à l'eutrophisation. Chaque zone bénéficie d'un statut de protection de son milieu marin contre la pollution, par signature en 1992 de la convention d'Helsinki pour la Mer Baltique et de la convention « OSPAR<sup>1</sup> » (provenant du nom des commissions Oslo et Paris) pour l'Atlantique du nord-est (Manche et Mer du Nord incluses), et ce au travers d'une coopération des pays limitrophes. La convention d'Helsinki est appliquée depuis 2000 par la commission « HELCOM<sup>2</sup> » et vise au bon état écologique au travers d'une économie et d'activité sociale durable (HELCOM, 2002). La convention OSPAR est quant à elle entrée en vigueur en 1998.

---

<sup>1</sup> <https://www.ospar.org/convention>

<sup>2</sup> <https://helcom.fi/>

### 1.1. Manche/sud de la Mer du Nord

Les mers épicontinentales sont des expansions océaniques sur le plateau continental. La Manche et la Mer du Nord en sont deux exemples, situés sur le plateau continental de l'Atlantique nord-est. La Manche est considérée comme une zone de transition entre les latitudes boréales de la Mer Baltique et la Mer du Nord et les écosystèmes atlantiques tempérés (Southward et al., 2005). La Manche et la Mer du Nord sont soumises à un régime mégatidal, connectées entre elles par le détroit du Pas de Calais (ou Strait of Dover), sous influence directe des eaux atlantiques par l'ouest et le nord et bénéficiant d'apports estuariens en provenance de la mer Baltique (via les détroits du Skagerrak, Kattegat et Sund) à l'est, et d'apports de fleuves de plaine tempérés, dont les principaux étant (du nord au sud) l'Elbe, la Meuse, le Rhin, l'Escaut, la Tamise, les estuaires de la Côte d'Opale (Slack, Wimereux, Canche, Authie), la Somme et la Seine. Le nord et le sud de la Mer du Nord sont délimitées par le front de Flamborough head, allant de la côte est anglaise jusqu'aux côtes danoises. La partie nord est continuellement stratifiée alors que la partie sud est continuellement mélangée (Fig. 13). La Manche, quant à elle, peut être subdivisée en Manche occidentale, Manche centrale et Manche orientale (Pingree, 1980). La Manche occidentale est stratifiée une grande partie de l'année, du printemps à la fin de l'automne, et est séparée de la partie continuellement mélangée de la Manche (centrale et orientale) par le front d'Ouessant (Fig. 13). Les apports en eau douce sont très hétérogènes, d'une part entre les côtes anglaises et côtes françaises et représentent  $15 \text{ km}^3$  par an. La Seine est le principal contributeur à ces apports, contribuant environ à 85% des apports en eau douce (Milliman and Farnsworth, 2013) sous forme d'une plume de dilution (Baie de Seine). L'hydrographie de la Manche et de la Mer du Nord est fortement influencée par les marées semi-diurnes dont la périodicité est de 14 jours (Baretta-Bekker et al., 2009; Pingree, 1980) provoquant ainsi une variabilité spatiale et temporelle des propriétés physiques des masses d'eaux. En effet, le marnage est important et entraîne la formation de courants de marée qui contribuent à déplacer continuellement les masses d'eaux en

créant des structures tourbillonnaires anticycloniques à méso-échelle près des côtes (Salomon and Breton, 1993 ; Fig. 14).



Figure 13 : Schéma des principaux fronts thermohalins retrouvés sur le plateau continental des eaux de l'Europe du nord-est (d'après Hill et al., 2008). La zone grisée représente la zone d'étude en Manche-Mer du Nord. Les régions en bleu clair sont les régions subissant une stratification thermique. Les régions en orange sont les régions subissant une stratification thermohaline. Les numéros 1, 2 et 3 en noir, correspondent aux subdivisions géographiques de la Manche, respectivement Manche orientale, Manche centrale et Manche occidentale. Les flèches vertes représentent les courants le long du plateau continental. Les flèches rouges, représentent les courants à proximité des fronts et leur direction. Leurs numéros associés correspondent aux fronts. 1. Front d'Ouessant ; 2. Front de la Mer Celtique ; 3. Front d'Islay ; 4. Front des îles Shetland ; 5. Front de Flamborough Head ; 6. Front Firsian.

En Manche, à large échelle temporelle les courants de marée génèrent une composante permanente appelée courant résiduel (Pingree and Maddock, 1977). Au niveau de la baie du Mont-Saint-Michel et de la baie de Lyme, ces courants résiduels sont moins puissants faisant des baies des zones plus sensibles aux apports terrigènes (Fig. 14). En Manche orientale, les eaux fluviales de la Somme, de l'Authie et de la Canche se mélangent au contact des masses d'eaux marines pour former des eaux saumâtres plaquées à la côte et emmenées vers le nord grâce à l'action combinée du courant résiduel de marée orienté ouest-est et de l'effet de goulet d'étranglement entre la Manche et la Mer du Nord au niveau du Déroit du Pas-de-Calais et forment un « fleuve côtier » (Brylinski, 1991). En Mer du Nord, une *Region Of Freshwater Influence* (ROFI) est également observée depuis l'embouchure des estuaires belgo-néerlandais jusqu'en Mer des Wadden grâce aux apports successifs et continus de la Meuse, de l'Escaut et du Rhin (Desmit et al., 2015; Lacroix et al., 2007; Ruddick and Lacroix, 2006). Ces quatre fleuves contribuent à 60% des apports en eau douce de l'ensemble de la Mer du Nord, brassant  $90 \text{ km}^3$  d'eau douce annuellement contre  $2.8 \text{ km}^3$  pour la Tamise (Milliman and Farnsworth, 2013), responsable d'une plume de dilution. Au centre de la Manche, une langue d'eau plus salée provenant de l'Océan Atlantique rentre par l'ouest, traverse d'ouest en est et se prolonge à travers le Déroit du Pas de Calais (Strait of Dover) jusqu'en Mer du Nord (Fig. 14). Un second courant atlantique arrive par le nord de la Mer du Nord, longe les côtes norvégiennes pour entrer, par le fond, en Mer Baltique. Une partie des eaux atlantiques longe également les côtes anglaises avec d'être déviée vers l'est et remonter le long des côtes danoises, en suivant le front de Flamborough head (Fig. 13).

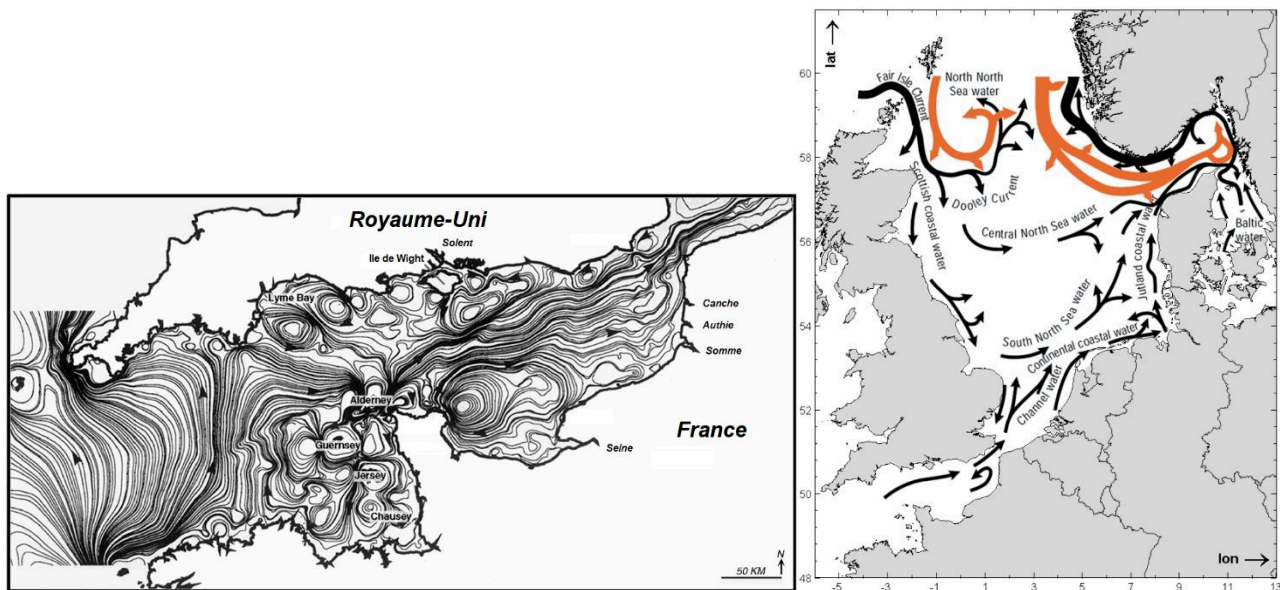


Figure 14 : Gauche : Courants résiduels de marée de surface en Manche, issus d'un modèle, d'après Ménesguen & Gohin (2006). Droite : Courants résiduels de marée de surface en Mer du Nord tiré du rapport de la commission OSPAR (2000) et d'après Turrell (1992). Les flèches orange indiquent les eaux uniquement provenant de l'Océan Atlantique. Les flèches noires indiquent les eaux atlantiques mélangées aux eaux côtières.

Les conditions météorologiques de la Manche et de la Mer du Nord notamment la température, l'irradiance, les vents et les précipitations présentent une cyclicité au cours de l'année et provoquent une variabilité spatio-temporelle des propriétés physico-chimiques des masses d'eaux. En effet, on observe des masses d'eaux plus chaudes en été qu'en hiver grâce à l'augmentation de l'irradiance qui réchauffe les premiers mètres de la colonne d'eau. En Manche occidentale et dans la partie nord de la Mer du Nord, l'absence de mélange au printemps entre les couches de surface et de fond et le réchauffement des eaux de surface vont permettre l'établissement d'une thermocline saisonnière. Cette stratification thermohaline temporaire perdure jusqu'à l'automne. Dans le « fleuve côtier » le long de la côte est de la Manche orientale en France (Brylinski and Lagadeuc, 1990) et la « rivière côtière » au nord de la zone côtière belge (Lacroix et al., 2007; Lancelot et al., 2014), la faible profondeur et le fort courant de marée ( $1,0$  à  $2,5 \text{ m.s}^{-1}$ ) génèrent un mélange constant de la colonne d'eau (Gentilhomme and Lizon, 1997) ce qui empêche la formation d'une thermocline saisonnière (Peeters et al., 1991) mais dont une thermocline et une halocline peuvent apparaître temporairement à l'échelle journalière,



pendant le flot et le jusant (Lefebvre et al., 2011). La séparation entre la zone stratifiée et la zone mélangée entre la Manche centrale de la Manche occidentale est marquée par le front thermique d'Ouessant. En Mer du Nord, une séparation est observée entre la zone mélangée (partie sud de la Mer du Nord) et la zone stratifiée (partie centrale de la Mer du Nord) allant de l'Angleterre au Danemark et connue sous le nom de front de Flamborough head (Pingree, 1980; Pingree and Griffiths, 1978). Ces fronts présentent une dynamique spatio-temporelle où leur position fluctue en fonction des marées et des saisons en Manche (Hoch and Garreau, 1998). La spatialité horizontale est caractérisée par un changement brusque de la température de l'ordre de plusieurs degrés Celsius en quelques kilomètres (Fig. 15 ; Hoch and Garreau, 1998; Simpson and Sharples, 2012) entre les zones chaudes et stratifiées (Manche occidentale) et les zones plus froides et mélangées (Manche orientale). En hiver, les eaux atlantiques, plus chaudes, pénètrent dans la Manche par la partie occidentale. Les eaux côtières sont alors les plus froides. Progressivement, la colonne d'eau se réchauffe et se stabilise pour former un front thermique et tidal : le front d'Ouessant. Dès le début de l'été, le gradient de température commence à s'inverser. Les eaux côtières deviennent plus chaudes que les eaux du large qui vont alors contribuer fortement à réchauffer la partie orientale de la Manche. En fin d'été, le gradient de température longitudinal s'est inversé et le bassin oriental de la Manche se retrouve plus chaud que le bassin occidental. La disparition du front, les tempêtes et les pluies vont permettre un retour à la situation hivernale initiale.

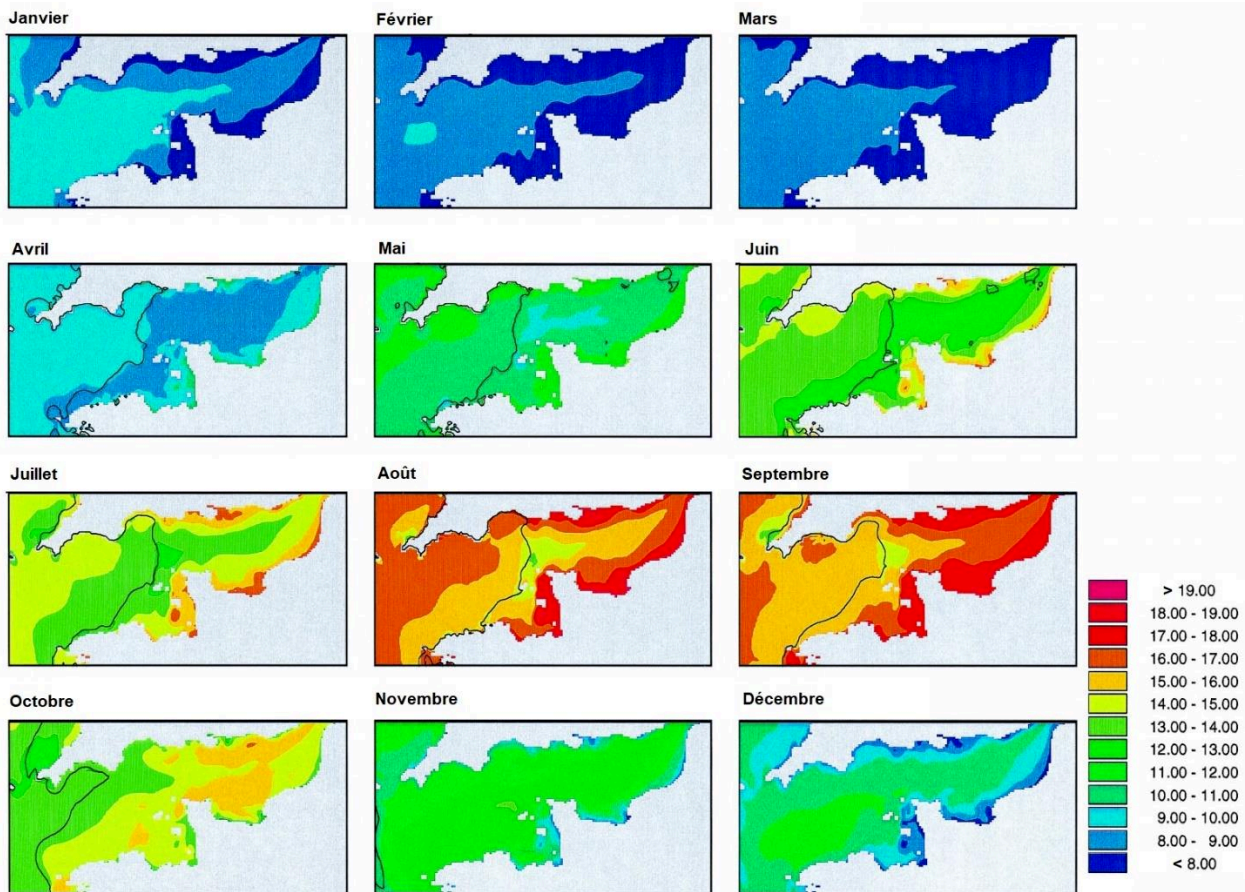


Figure 15 : Modélisation sur 3 ans des variations spatio-temporelles de la température (°C) et du front d'Ouessant en Manche, moyennées par mois sur une année (d'après Hoch et Garreau, 1998).

Bien que la salinité de la Manche soit relativement élevée ( $> 34$  PSU sauf près des estuaires ; Lacroix et al., 2004), il existe une stratification haline quasi-permanente au niveau de la Baie de Seine (Menesguen and Hoch, 1997) et des estuaires belgo-néerlandais (Baretta-Bekker et al., 2009) tandis qu'elle est très faible au niveau de la Tamise due à un mélange vertical puissant et permanent (Preddy, 1954). Les différentes composantes physiques tant horizontales que verticales vont alors engendrer des structurations spatio-temporelles des composantes biogéochimiques, biologiques et optiques propres à chacune des zones (Aiken et al., 2004; Bonato et al., 2016; Gentilhomme and Lizon, 1997; Groom et al., 2009; Lacroix et al., 2004; Ruddick and Lacroix, 2006; Vantrepotte et al., 2007). Ainsi, en Manche orientale et sud Mer du Nord, les stocks de nutriments sont à leur maximum en fin d'hiver,

l'eau étant enrichie en azote et phosphore et pauvre en silicates (où le ratio hivernal N/P > 16) et peut mener à une eutrophisation le long des côtes. Ce déséquilibre entre les nutriments, couplé à l'augmentation progressive de la quantité et qualité de la lumière, permet la mise en place des blooms de diatomées principalement le long des côtes de la Manche et de la Mer du Nord ainsi qu'à proximité des estuaires (Lacroix et al., 2007). Après un premier bloom de diatomées au début du printemps, le ratio N/P chute brutalement entraînant une limitation de l'azote par rapport au phosphore. Lorsque le niveau de silicates est inférieur à  $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , un bloom de l'haptophyte *Phaeocystis globosa* se développe dans les eaux légèrement dessalées du « fleuve côtier » et des estuaires belgo-néerlandais jusqu'en Mer de Wadden (Fig. 16 ; Lancelot et al., 2014; Lefebvre et al., 2011; Reid et al., 1990; Riegman et al., 1992; Riegman and Van Boekel, 1996). Parfois, des blooms de *P. globosa* sont également observés ou modélisés au niveau de l'estuaire de la Tamise (e.g. Lancelot et al., 2014; Weston et al., 2008). En été, la Manche occidentale présente des conditions stables, chaudes et une forte stratification avec des blooms conjoints de dinoflagellés (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Pingree et al., 1977, 1975) et coccolithophoridés (Holligan et al., 1983; Houghton, 1988; Vanhoutte-Brunier et al., 2008). La Manche centrale et orientale quant à elles, présentent de nombreux fleuves dont les plus importants sont la Seine et la Somme en France et le Solent en Angleterre. L'augmentation des apports fluviaux et les tempêtes en fin d'été et début d'automne dans les zones côtières apportent/remettent en suspension des nouveaux nutriments qui pourront permettre un second bloom de diatomées et, parfois, de *Phaeocystis globosa* également en Manche orientale alors que les vents et pluies vont contribuer à l'érosion de la thermocline en Manche occidentale ce qui va entraîner la disparition du front d'Ouessant.

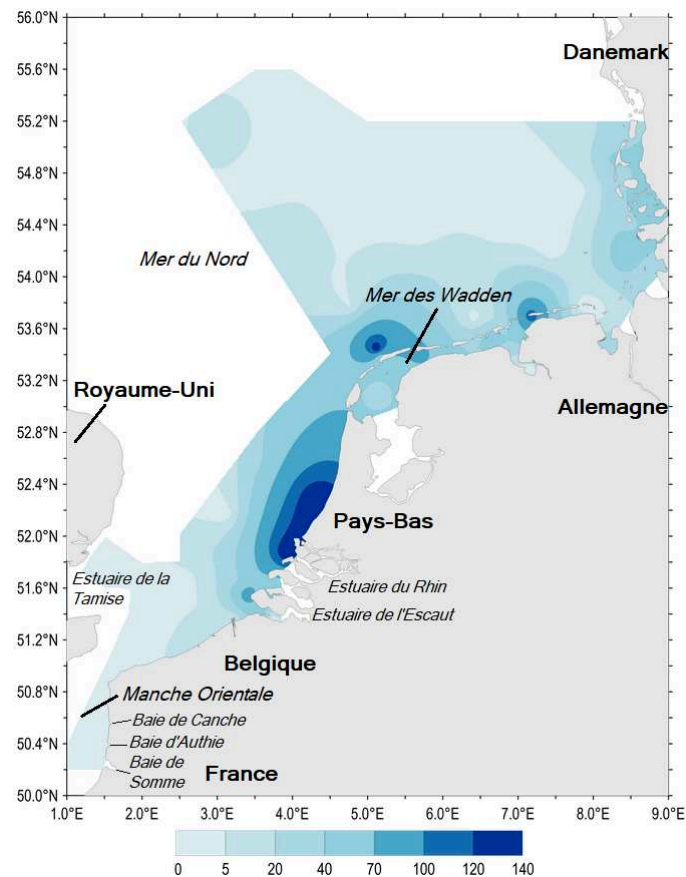


Figure 16 : Gradients de maxima d'abondance de *Phaeocystis* spp. (million de cellules par litre) en sud de la Mer du Nord pendant la période avril-août des années 1990 à 2014. Disponible sur le site internet d'OSPAR<sup>3</sup>.

## 1.2. Mer Baltique

La Mer Baltique est une mer intracontinentale semi-fermée du Nord-Est de l'Europe. Elle est subdivisée en plusieurs bassins dont les principaux sont repris figure 17. Son unique ouverture se situe à l'est avec la Mer du Nord par le Kattegat et le Skagerrak. Considérant les échelles géologiques, il s'agit d'une mer jeune résultant de la fonte de l'inlandsis scandinave à la fin de la glaciation vistulienne (il y a environ 14 000 ans ; Feistel et al., 2008). En comparaison, la Manche s'est formée progressivement entre 450 000 et 180 000 ans. La salinité actuelle de la Mer Baltique résulte d'une dessalure progressive pendant 12 000 ans entre les eaux salées de la Mer du Nord (en provenance de l'Atlantique) et les eaux douces issues de la fonte des glaciers et les apports des fleuves et s'est

<sup>3</sup> <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/intermediate-assessment-2017/pressures-human-activities/eutrophication/trends-phaeocystis-blooms/>

stabilisée depuis environ 2000 ans. On qualifie ainsi la Mer Baltique d'écosystème saumâtre (ou système estuarien). Les apports annuels en eau douce sont de  $375,90 \text{ km}^3$ , ce qui représente légèrement plus du double des apports en eau douce en Manche et Mer du Nord combinés ( $179,77 \text{ km}^3$ ). Un gradient de salinité de 2 à 30 PSU est observé d'est en ouest (Hu et al., 2016). La salinité fluctue annuellement grâce aux apports des fleuves (Neva et Kymijoki dans le Golfe de Finlande, Daugava dans le Golfe de Riga, ainsi que de nombreux fleuves dans le Golfe de Bothnie) notamment lors de la fonte des glaces et des neiges et apparaît la plus forte au printemps alors qu'elle est la plus faible au mois de mai. Les apports annuels en eaux douces représentent  $376 \text{ km}^3$ , provenant à 44% du Golfe de Bothnie et 28% des pays baltes (Milliman and Farnsworth, 2013). Le bilan entre l'évaporation et les apports en eau douce est négatif ce qui permet à la Mer Baltique de garder une salinité toujours faible. En outre, elle présente une halocline profonde (dont la base se trouve à -60-80m) permanente (Reissmann et al., 2009). En été, alors que la stratification haline est présente, il y a mise en place d'une thermocline quand les précipitations diminuent et l'irradiance augmente ce qui entraîne un réchauffement des couches d'eaux de surface. Dès lors, le mélange vertical est très réduit. (Olli and Seppälä, 2001; Wasmund and Uhlig, 2003). Les détroits du Kattegat et du Skagerrak sont considérés comme des zones de transition entre la Mer Baltique et la Mer du Nord. Le Skagerrak et le Kattegat sont caractérisés par une stratification haline avec la sortie des eaux dessalées de la Mer Baltique (8-12 PSU) en surface et l'entrée des eaux salées provenant de la Mer du Nord en profondeur (30-35 PSU). La Mer du Nord est séparée par un front permanent, le front du Kattegat (Fig. 17).



Figure 17 : Carte de la Mer Baltique, localisation des sous-régions et des principaux fleuves (d'après André, 2012). En rouge, zone du front du Skagerrak, séparant le Skagerrak (Mer du Nord) du Kattegat.

En Mer Baltique, la combinaison de la stratification et de l'eutrophisation a réduit la disponibilité en oxygène et créé des zones hypoxiques (Diaz, 2001). La zone hypoxique en Mer Baltique couvre 49 000 km<sup>2</sup> en moyenne, ce qui en fait le plus vaste des écosystèmes anthropisés sur le globe (Rabalais et al., 2010). En comparaison, le Golfe du Mexique, la Baie de Chesapeake et la Mer Noire représentent 13 500, 11 400 et 40 000 km<sup>2</sup> (Rabalais et al., 2010). Seules les zones à minimum d'oxygène, à proximité des upwellings, réunies ont une superficie plus vaste (environ 30 millions de km<sup>2</sup>). Cette anoxie a pour conséquence un relargage des phosphates au niveau des sédiments, qui par un transport vertical se retrouvent dans les eaux de surface et entraînent un rapport azote sur phosphate en dessous du rapport de Redfield (Reissmann et al., 2009). Après épuisement des stocks d'azote à la suite des

blooms printaniers de diatomées, l'excès de phosphate par rapport aux nitrates va profiter aux cyanobactéries qui fixent le N<sub>2</sub> et qui pourront développer un bloom estival lorsque les eaux seront chaudes et stratifiées (Bianchi et al., 2000; Wasmund, 1997).

## 2. Les campagnes océanographiques

### 2.1. Campagne CAMANOC – Manche occidentale/Manche centrale – Été 2014

La campagne halieutique CAMANOC pour Campagne MANche OCCidentale a eu lieu en Manche occidentale et en Manche centrale lors de la transition été-automne 2014 (16 septembre au 13 octobre), partant de Brest et se terminant à Boulogne sur Mer (Fig. 18). Elle a été mise en place par l'IFREMER pour pallier aux manques de données biologiques concernant l'ensemble des organismes benthiques et pélagiques dans cette zone, et permettre de répondre aux politiques publiques dans le cadre de l'approche écosystémique des pêches combiné à l'application de la Directive Cadre Stratégie sur le Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/EC). La stratégie d'étude de la zone est qualifiée de « end-to-end » puisque la plupart des compartiments de l'écosystème ont été inspectés : des paramètres hydrologiques à l'observation des mammifères et oiseaux marins, ceci grâce à diverses méthodes d'échantillonnage, de référence ou innovantes. Des enregistrements *in vivo ex situ* en continu en sub-surface sont combinés aux traditionnelles mesures discrètes réalisées sur des stations fixes.



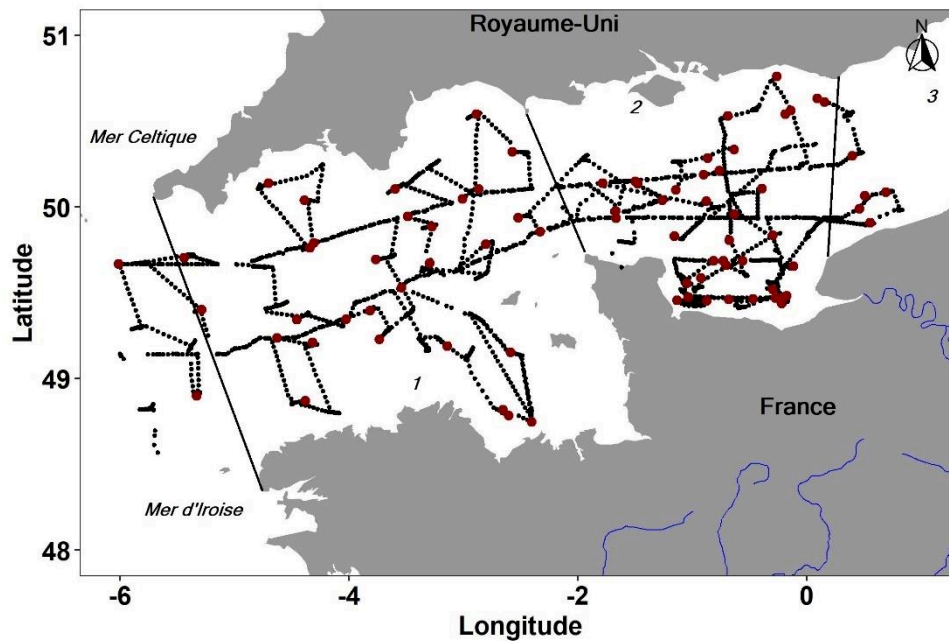


Figure 18 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors de la campagne CAMANOC (16 septembre au 13 octobre 2014). La Manche est subdivisée en Manche occidentale (1), Manche centrale (2) et Manche orientale (3).

## 2.2. Campagnes PHYCO, VLIZ, RWS – Manche orientale/sud Mer du Nord – Printemps 2017

Les campagnes PHYCO à bord du N.O. « Côtes de la Manche » (INSU CNRS) du 21 au 30 avril 2017, JERICO-LifeWatch à bord du N.O. « Simon Stevin » (VLIZ), du 8 au 12 mai 2017 et MWTL (Monitoring Waterstaatkundige Toestand des Lands, pouvant être traduit par le suivi de la qualité des eaux des Pays-Bas) à bord du N.O. « Zirfaea » (RWS) du 15 au 18 mai 2017, se sont déroulées successivement sur 1 mois, le long du continuum Manche orientale - sud Mer du Nord (Fig. 19). L'objectif de chaque campagne était de définir les propriétés biogéochimiques et bio-optiques des masses d'eaux et de caractériser les communautés phytoplanctoniques et rendre compte de leur distribution selon un gradient côte-large et ouest-est, ceci dans le contexte du déroulement des blooms printaniers de diatomées et de l'haptophyte *Phaeocystis globosa*. Pour ce faire, des enregistrements *in vivo ex situ* en continu en sub-surface combinés à des mesures et prélèvements discrets en stations fixes ont été réalisés.



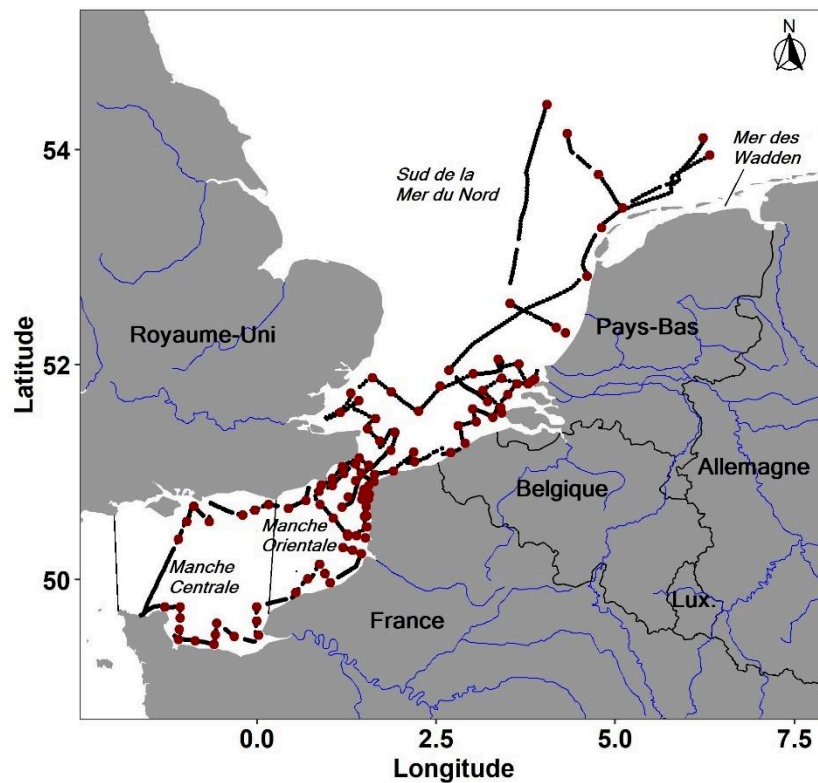


Figure 19 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors des campagnes PHYCO (21 au 30 avril 2017), VLIZ (8 au 12 mai 2017) et RWS (15 au 18 mai 2017).

### 2.3. Campagne Aranda – Mer Baltique/Kattegat/Skagerrak – Été 2017

La campagne « Aranda » s'est déroulée du 10 au 17 juillet 2017 en Mer Baltique, et dans les détroits du Kattegat et du Skagerrak (Fig. 20). Elle a été organisée par l'Institut Suédois de Météorologie et d'Hydrologie (SMHI) à bord du navire océanographique « Aranda » (SYKE). La zone d'étude est caractérisée par un gradient longitudinal de température et de salinité responsable des variations de distribution du phytoplancton et notamment des blooms de cyanobactéries en été. L'objectif de cette campagne a été d'étudier les distributions horizontale et verticale de différents groupes phytoplanctoniques grâce à des techniques innovantes (Cytométrie automatisée, imagerie, fluorimétrie multispectrale), notamment des cyanobactéries filamenteuses, responsables de blooms estivaux en Mer Baltique, des dinoflagellés formant des blooms dans la colonne d'eau dans le Kattegat-Skagerrak, ainsi que du pico- et nanophytoplancton dont les haptophytes potentiellement toxiques mixotrophes

*Prymnesium parvum* et *Prymnesium polylepis* (Larsson et al., 2014) qui forment parfois des blooms de nanoflagellés en Mer Baltique et détroits Kattegat-Skagerrak.

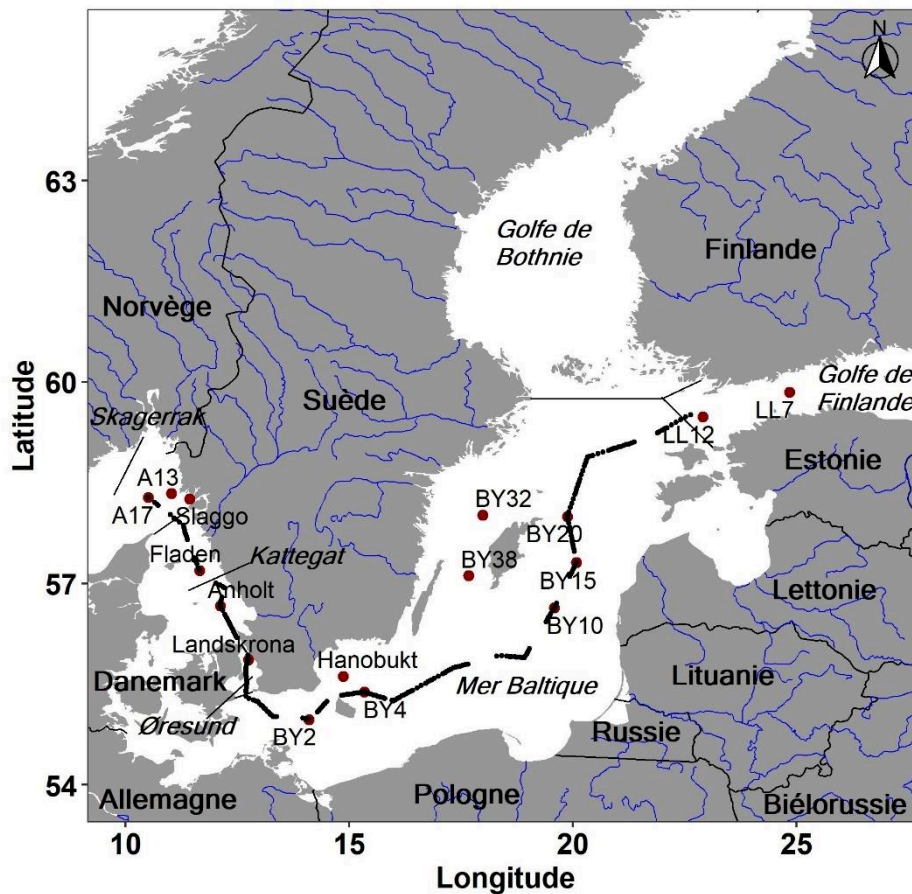


Figure 20 : Carte de l'échantillonnage en continu (points noirs) et des stations visitées (points rouges) lors de la campagne ARANDA en Mer Baltique (10 au 17 juillet 2017).

### 3. La cytométrie en flux

#### 3.1. Etat de l'art

La cytométrie en flux est d'abord utilisée en immunologie où les cellules sont marquées avec différents marqueurs fluorescents (fluorochromes) permettant de discriminer des groupes fonctionnels de cellules selon leurs propriétés optiques (Olson et al., 1989). Cette caractérisation des propriétés optiques dans un faible volume a intéressé les biologistes marins notamment pour l'étude des cellules de petite taille ( $< 10 \mu\text{m}$ ), difficilement discernables par la microscopie traditionnelle et uniquement détectées en microscopie à épifluorescence (Olson et al., 1990; Yentsch and Yentsch, 1979). En effet,

la cytométrie en flux est particulièrement adaptée à l'étude du phytoplancton, bactéries et virus (Marie et al., 2010; Ribalet et al., 2010) puisqu'elle utilise l'autofluorescence des pigments chez les eucaryotes et les procaryotes autotrophes (après excitation par une lumière adaptée au spectre d'absorption des pigments) ou une fluorescence induite via un marquage par des fluorochromes de l'ADN pour le dénombrement de l'ensemble des procaryotes et eucaryotes, ou de certaines séquences pour discriminer et détecter des groupes ou espèces (Fluorescent In Situ Hybridisation- FISH). La cytométrie en flux permet la caractérisation et l'énumération des cellules ou colonies au sein de groupes phytoplanctoniques et la quantification des propriétés optiques dérivées de chacune d'entre elles (taille, pigmentation, ...), propriétés qui définissent alors chaque groupe phytoplanctonique (Olson et al., 1989). A la fin des années 1980, les premières études utilisant la cytométrie en flux en océanologie vont se centrer sur la biodiversité, l'étude des structures microscopiques et des flux (Legendre et al., 2001). L'opérabilité sur des navires scientifiques a alors permis de découvrir de nouveaux genres et espèces, indiscernables au microscope. C'est le cas de *Prochlorococcus* spp. (Chisholm et al., 1988), genre de cyanobactérie picoplanctonique pouvant représenter jusqu'à 80% de l'ultraplancton dans la partie centrale de l'Océan Atlantique mais encore *Ostreococcus tauri* qui a été identifié la première fois dans les lagunes méditerranéennes (Chrétiennot-Dinet et al., 1995). L'étude de *Synechococcus* spp. par cytométrie en flux, autre cyanobactérie de taille légèrement plus grande, a pu mettre en évidence la diversité pigmentaire au sein de genre (Wood et al., 1985) ainsi que sa distribution en milieu côtier et dans les panaches estuariens (Vaulot and Xiuren, 1988). D'autre part, le marquage cellulaire par les fluorochromes, couplé aux analyses cytométriques, ont permis d'étudier : 1) le cycle de vie des organismes et la détermination des taux de croissance des organismes (e.g. Marie et al., 1997 ; Vaulot et al., 1995), 2) la caractérisation et le comptage d'organismes hétérotrophes comme les bactéries, les virus ou les protistes (e.g. Rose et al., 2004 ; Marie et al., 1997 ; Li, Dickie, 2001) et 3) l'activité enzymatique par évaluation des niveaux de fluorescence après marquage (e.g. González-Gil et al., 1998). L'utilisation de marqueurs immunofluorescents permet

aussi l'étude d'algues nuisibles et certaines espèces peuvent être mises en évidence via le FISH couplé à la cytométrie en flux, comme cela a été le cas pour *Gyrodinium aureolum* (Vrieling et al., 1996).

### 3.2. Application de la cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » dans l'étude *in vivo* du phytoplancton dans le milieu

Bien que les champs d'application de la cytométrie en flux soient vastes, la plupart des études portent sur des expérimentations *in vitro* et beaucoup moins sur des observations *in situ* (Legendre et al., 2001). Des capteurs dédiés aux analyses *in vivo* à visée *in situ* ont ainsi été développés et commercialisés à partir du début des années 2000 : SeaFlow (Swalwell et al., 2011), CytoSense et CytoSub (Dubelaar et al., 1999 ; CytoBuoy b.v., Pays-Bas). L'avènement de ces techniques a permis d'automatiser le processus de prélèvement, d'injection et l'analyse et, grâce au recyclage ou à l'absence de liquide gaine (liquide sous pression permettant d'entraîner et d'étirer l'échantillon), a permis de rendre ces capteurs autonomes pour une mise en place sur des bouées automatisées ou des navires. A l'heure actuelle, la plupart des travaux ont porté sur le CytoSense et la CytoSub. Ainsi, l'utilisation du CytoSense/CytoSub peut accroître la résolution spatiale (*e.g.* Thyssen *et al.*, 2005; Hamdi *et al.*, 2013; Bonato *et al.*, 2015) et/ou temporelle (Dugenne et al., 2014; Thyssen et al., 2014b). En outre, l'enregistrement des signatures cytométriques des particules détectées pour le CytoSense fournit des informations supplémentaires en calculant des attributs (*chapitre 2, partie 3.1.1*) sur les signaux optiques. Il est alors possible de définir des traits morphologiques, physiologiques et comportementaux (Litchman and Klausmeier, 2008) au niveau individuel grâce à l'utilisation des signatures cytométriques (Fontana et al., 2014; Pomati et al., 2013; Weithoff and Beisner, 2019). L'automatisation de la cytométrie en flux permet le couplage avec d'autres capteurs à haute fréquence pour l'étude de la composition des communautés phytoplanctoniques en lien avec des mesures de production primaire (Aardema et al., 2019) ou avec les paramètres biogéochimiques et physiques (Marrec et al., 2018). Enfin, l'acquisition d'images dans certains cas permet d'obtenir une résolution

taxinomique quasiment absente avant l'apparition de ces capteurs (Dugenne et al., 2014; Pereira et al., 2018).

### 3.3.Principe

La cytométrie en flux est une technique ayant pour but la caractérisation optique automatisée et le comptage des particules entraînées dans un flux intersectées par une source d'excitation lumineuse (le plus souvent un laser). Elle est basée sur trois systèmes interagissant entre eux : le système fluidique, le système optique et le système électronique (Fig. 21). La caractérisation des particules se fait en fonction de leurs critères optiques intrinsèques et résultent en une diffusion de la lumière (aux grands et petits angles) ainsi qu'en l'émission de fluorescence, naturelle ou induite via des marqueurs fluorescents. Néanmoins, ces critères morphologiques et parfois physiologiques (fluorescence naturelle) sont enregistrés uniquement à leurs valeurs maximales par la plupart des cytomètres en flux. Le système fluidique des cytomètres en flux regroupe la séparation, l'alignement et la vitesse d'analyse de l'échantillon. Il est couplé au système optique composé de la ou les sources lumineuses et des détecteurs (photodiode, photomultiplicateurs) des signaux lumineux émis par les particules. Enfin, le système électronique permet la collecte et l'analyse des signaux via les photomultiplicateurs.

La cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » avec le CytoSense/CytoSub, permet l'automatisation des mesures sur un flux continu à bord des navires, stations fixes de mesures et *in situ*, ainsi que l'obtention de paramètres morphologiques et physiologiques dérivés du « pulse shape » de chaque particule, c'est-à-dire de l'enregistrement complet du profil optique du passage de la particule devant un ou plusieurs faisceaux laser. Une caméra peut être associée aux mesures et des images permettent de compléter ces paramètres optiques et d'avancer vers une résolution taxinomique des cellules de grande taille et colonies (Dugenne et al., 2014; Pereira et al., 2018) et de définir de nouvelles caractéristiques (largeur de la cellule, estimation du volume, répartition du noyau et des organites parfois).

Au cours de cette thèse de doctorat, la totalité des travaux a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux de type « pulse shape-recoding » (un CytoSense et un CytoSub, CytoBuoy b.v).

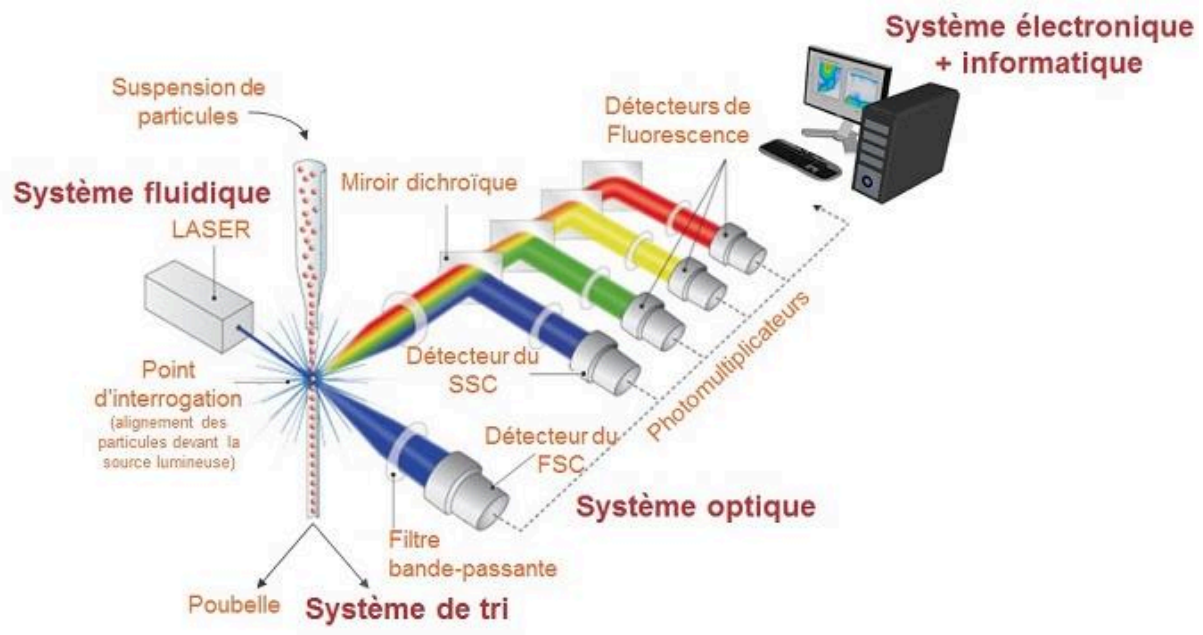


Figure 21 : Principe de la cytométrie en flux et interopérabilité des différents systèmes (fluidique, optique, électronique et si disponible tri). FSC représente le « forward scatter » et SSC représente le « sideward scatter ». Tiré du site internet du plateau technique de cytométrie en flux de l'université de Reims<sup>4</sup>.

## 4. La cytométrie en flux automatisée de type « pulse shape-recording »

### 4.1. Vocabulaire

La cytométrie en flux ayant déjà recours à un vocabulaire spécifique, la cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » s'appuie dessus et possède elle-même son propre vocabulaire qu'il est nécessaire de rappeler afin d'éviter toute confusion entre les techniques. La partie ci-dessous propose ainsi une liste des termes utilisés :

**Gating :** Méthode de partitionnement qui consiste à agréger ensemble les particules ayant des propriétés optiques similaires. Un groupe possédant des particules optiquement similaires est appelé un cluster.

<sup>4</sup> <https://www.univ-reims.fr/site/plataux-techniques/plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html?>

« Pulse shape » : Il s'agit d'un ensemble de signaux optiques dont la totalité des signaux définissent une signature optique cytométrique propre à chaque particule détectée. L'intersection entre une particule et un laser provoque une déviation du faisceau laser à différents angles et potentiellement à l'émission de fluorescence (dans le cas du phytoplancton ou de cellules marquées par des fluorochromes). Dans le cas des cytomètres CytoBuoy<sup>®</sup>, la conversion des signaux optiques en signaux électriques définit une signature cytométrique basée sur la composition interne et externe de la particule (Fig. 22).

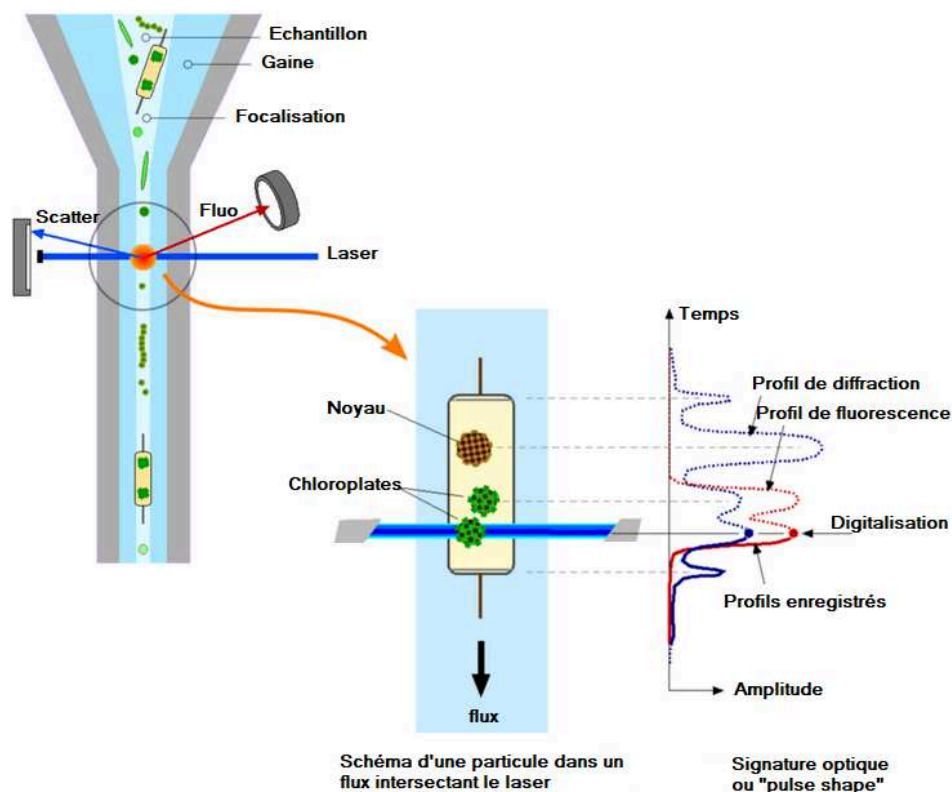


Figure 22 : Principe de l'enregistrement du « pulse shape » du CytoSense. Tiré de <https://www.cytobuoy.com>

Signaux : Chaque particule génère un « pulse shape » à l'intersection avec le laser, défini par cinq signaux : le forward scatter (FWS, proxy de taille), le sideward scatter (SWS, proxy de composition interne et externe), et la fluorescence rouge (FLR) correspondant à la réémission naturelle de lumière (i.e. autofluorescence) de la chlorophylle *a*, orange (FLO, autofluorescence de phycobilines et de la phycoérythrine) et jaune (FLY, autofluorescence des pigments de dégradation). Il est alors possible de

déterminer des attributs sur chaque signal. Chaque signal sera plus amplement détaillé dans la partie intitulée *4.3 Unité optique* de ce chapitre.

Attributs : Dix caractéristiques sont calculées à partir du « pulse shape » de chaque signal alors qu'en cytométrie classique on ne dispose que de la hauteur, la surface et la longueur. Ces caractéristiques sont : longueur, intégrale, maximum, la moyenne, inertie, le centre de gravité, le facteur de remplissage, l'asymétrie, le nombre de cellules et le temps de passage. Le site du constructeur (<https://www.cytobuoy.com/>) fournit une description détaillée de chacune des caractéristiques ainsi que la formule associée pour les recalculer ; celles-ci seront détaillées dans la partie *5.1.1. caractéristiques du « pulse shape »*.

## 4.2. Unité fluide

Le système fluide peut être subdivisé en deux parties : l'échantillon (ensemble de particules mises en suspension dans un liquide) et un liquide gaine. Le système dans lequel passe l'échantillon est dit ouvert tandis que le système du liquide gaine est fermé. Le liquide gaine est un liquide sous pression permettant d'entraîner et d'étirer l'échantillon. Dans notre cas, il est constitué d'eau de mer filtrée sur 0,2  $\mu\text{m}$  afin d'éliminer le maximum de particule organique et inorganique. Au cours de la thèse, la fréquence de remplacement a été bi-mensuelle. Lors du stockage du cytomètre (inactivité supérieure à 2 semaines), ce liquide est remplacé par de l'eau Milli-Q évitant la formation de précipité de sels ainsi que la prolifération de bactéries.

Tout d'abord, l'échantillon va être aspiré dans un tube de 800  $\mu\text{m}$  de diamètre interne par une pompe péristaltique programmable, dont la vitesse est variable (comprise entre 0,1 et 19  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Par conséquent, toutes les particules dont la largeur ou le diamètre sera égal ou supérieur à 800  $\mu\text{m}$  ne passeront pas. Dans le cas du phytoplancton, il est toutefois possible d'analyser les plus larges colonies de *Phaeocystis globosa* puisque celles-ci possèdent une matrice d'exopolysaccharides qui leur permet une déformation. Cependant, dues à cette déformation, leurs propriétés morphologiques seront modifiées lors de leur détection. L'échantillon arrive ensuite dans l'injecteur, où il va rencontrer un



liquide gaine dont la vitesse va passer de  $1 \text{ cm.s}^{-1}$  à  $200 \text{ cm.s}^{-1}$  grâce à une section conique. Puisque la vitesse augmente, la section de l'échantillon diminue, ce qui va créer un flux laminaire, étirant l'échantillon et permettant le passage des particules en file indienne. Grâce à ce flux laminaire, l'échantillon et le liquide gaine sont en contact l'un avec l'autre mais ne se mélangent pas. Ce processus est défini comme étant le principe de focalisation hydrodynamique (Fig. 23).

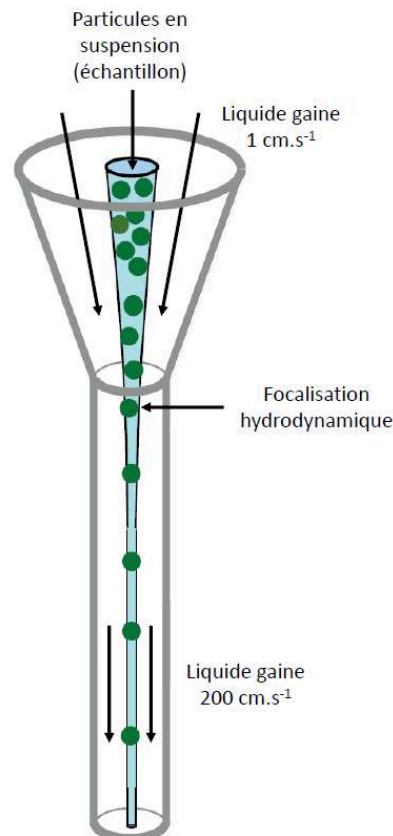


Figure 23 : Principe de la focalisation hydrodynamique. La section conique permet au liquide gaine d'accélérer de  $1 \text{ cm.s}^{-1}$  à  $200 \text{ cm.s}^{-1}$ . L'accélération du liquide gaine génère un flux laminaire qui entraîne l'étirement de l'échantillon en un flux de particules en file indienne

Afin de limiter la réfraction (i.e. déviation d'un faisceau lumineux lors de son passage d'un milieu à un autre), il faut que l'échantillon et le liquide gaine aient des propriétés optiques similaires. Lors des analyses effectuées sur des échantillons marins, le liquide gaine est composé ainsi d'eau de mer filtrée sur  $0,2 \mu\text{m}$ , régénéré avec le passage des échantillons.

Finale­ment, l'automatisation totale du système est permise grâce à la pompe péristaltique programmable, un système de mise en place d'un ou plusieurs protocoles de mesure à l'avance dans une interface de commandes, et au recyclage du liquide de gaine. Ces caractéristiques permettent l'implémentation du CytoSense lors de campagnes en mer ou sur des bouées (fixes ou mobiles), hors de l'eau (version CytoSense) ou même immergée (versions CytoSub et CytoBuoy).

### 4.3. Unité optique

Après avoir été entraînée par la pompe péristaltique et le liquide gaine jusque dans la cuvette de mesure, chaque particule de l'échantillon est intersectée par un laser, dans le cas présent émettant à 488 nm (Solid state Sapphire, Coherent Inc), de 5  $\mu\text{m}$  de largeur et d'une puissance de 50 mW. L'intersection entre le laser et chaque particule dévie le faisceau du laser dont la lumière diffuse dans différents angles et, dans le cas du phytoplancton, émet de la fluorescence dont l'intensité et la longueur d'émission dépendent du type de pigments photosynthétiques et de l'état physiologique des cellules. On distingue une diffusion aux petits angles (0 à 15° ; Forward Scatter, FWS), détectée par une photodiode (Positive Intrinsic Negative diode, PIN diode) et une diffusion aux grands angles (45 à 135° ; Sideward Scatter, SWS) collectée par les photomultiplicateurs (PMT). La fluorescence est également collectée par ces photomultiplicateurs.

Dans le cas du CytoSense et du CytoSub acquis au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, les signaux détectés sont : le Forward Scatter, le Sideward Scatter, la fluorescence rouge, la fluorescence orange et la fluorescence jaune.

- Le Forward scatter (FWS) : il s'agit de la déviation de la lumière aux faibles angles (0 à 15°). Le FWS est proportionnel à la taille de la particule.
- Le Sideward scatter (SWS) : Il s'agit de la déviation de la lumière aux grands angles (90° à 145°). Il est un proxy de la composition interne et externe de la particule. Dans le cas du phytoplancton, l'intensité du SWS peut être associée à la présence ou non de plaques calcaires

(coccolithes) chez les coccolithophoridés, de thèques chez certains dinoflagellés. Elle va également être variable selon la taille des organites (vacuoles, mitochondries...).

- La fluorescence rouge (FLR) : autofluorescence de la chlorophylle *a* qui sert à estimer la contribution de chaque particule ou cluster à la « biomasse chlorophyllienne » (Li et al., 1993; Shimada et al., 1993).
- La fluorescence orange (FLO) : autofluorescence de la phycoérythrine et des pigments de protection (e.g. xanthophylles). Typiquement observée chez les cyanobactéries picoplanctoniques comme *Synechococcus* spp. (Wood et al., 1985) et les cryptophytes (Veldhuis and Kraay, 2000).
- La fluorescence jaune (FLY) : autofluorescence de la phycocyanine et des pigments en décomposition (principalement phaeopigments pour ce qui est de la chlorophylle *a*).

Une courbure est calculée et correspond à la différence entre le FWS droit et le FWS gauche. Toutefois, la largeur du faisceau du laser est plus large que les particules inférieures à 5 µm ce qui provoque une sur-estimation de la taille pour ces particules (Owen, 2014). Cette sur-estimation est corrigée avec l'ajout de billes de 3 et 10 µm via les équations 4 et 5 décrites dans la partie intitulée 5.3 *Contrôle qualité* de ce chapitre.

#### 4.4. Unité électronique

Chaque particule emmenée par le liquide gaine est intersectée par le laser et définit un « pulse shape » ou profil optique.

De manière générale, la construction du « pulse shape » est définie par un certain nombre de points et peut être reliée à la formule suivante :

$$\text{Nb}_{\text{points}} = 2 \times [5 + \text{longueur de la particule } (\mu\text{m})] \quad (2)$$

Au cours des différentes campagnes, le CytoSense est implémenté dans le « laboratoire sec » des navires. Il est relié en sortie du thermosalinomètre sur le N/O *Thalassa* (IFREMER), en sortie de la

Pocket FerryBox de l'IFREMER sur le N/O *Côtes de la Manche* (INSU), et en sortie de la FerryBox sur les N/O *Simon Stevin* (VLIZ), *Zirfaea* (RWS) et *ARANDA* (SYKE). Le CytoSense prélève et rejette l'échantillon dans une cuve dont le débit à la sortie doit être suffisamment important pour permettre un renouvellement de l'eau. Dans ces analyses, le débit est fixé à 2 L.min<sup>-1</sup>. Le prélèvement à lieu toutes les 10 minutes et est fixé automatiquement par le logiciel d'acquisition CytoUSB<sup>®</sup>. Ces 10 minutes se découpent en 1 minute de nettoyage (flush) et 9 minutes d'enregistrement. Le protocole d'analyse spécifique à l'enregistrement en continu est basé sur un seuil de détection de fluorescence rouge faible pour enregistrer la totalité du spectre de taille du phytoplancton. Ce seuil de détection est établi sur une mesure d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm en commençant à une valeur faible de ce seuil mais arbitraire et en l'augmentant progressivement jusqu'au seuil où le CytoSense ne détecte plus aucune particule non fluorescente ni trop de bruit machine. Ce seuil est alors conservé comme valeur. Il permet de distinguer les particules inertes, les cellules hétérotrophes et le bruit, du phytoplancton à partir du faible niveau de fluorescence rouge et de la déviation de la lumière (*e.g.* Green, Sosik and Olson, 2003; Agagliate, Lefering and McKee, 2018). Dans le cas d'échantillons discrets prélevés sur station, ce protocole est appliqué ainsi qu'un second, possédant un seuil de détection élevé sur la fluorescence rouge et une plus grande vitesse de passage. Ce second protocole est utilisé pour une meilleure détection des événements plus rares comme potentiellement le microphytoplancton, les cryptophytes et les coccolithophores.

## 5. Analyse des données cytométriques

En limnologie et en océanographie, la caractérisation des groupes cytométriques se fait traditionnellement par gating ou classification manuelle. Pour les données acquises par le CytoSense/CytoSub, le gating se fait via le logiciel CytoClus<sup>®</sup>. Des combinaisons d'axes (signaux + attributs ; chapitre 2, partie 5.1.2) sont utilisées pour identifier des amas de particules avec des propriétés optiques similaires. Quand un amas de particules est identifié, l'opérateur délimite ce groupe. Néanmoins, la caractérisation des groupes cytométriques est fortement subjective et dépend

aussi bien de l'opérateur, de ses performances intrinsèques mais aussi de la zone d'étude. Pour s'affranchir de ces contraintes, on peut être amené à utiliser la classification automatisée. Cette partie a pour but de décrire les méthodes de gating et de classification automatisée.

## 5.1. Analyse manuelle

### 5.1.1. Caractéristique du « pulse shape »

Chaque particule enregistrée par le CytoSense est définie à partir d'un nombre de points enregistrés pour reconstituer les signaux par particules (Eq. 1), Le logiciel CytoClus<sup>®</sup> dédié aux traitements de données des cytomètres en flux CytoBuoy<sup>®</sup> permet de définir neuf attributs par signal en plus du temps de passage de chaque particule devant le laser. Ces neuf attributs sont : la longueur, le total, le maximum, la moyenne, l'inertie, le nombre de cellules, l'asymétrie, le centre de gravité et le facteur de remplissage (Fig. 24). La définition détaillée de chaque paramètre est donnée ci-dessous :

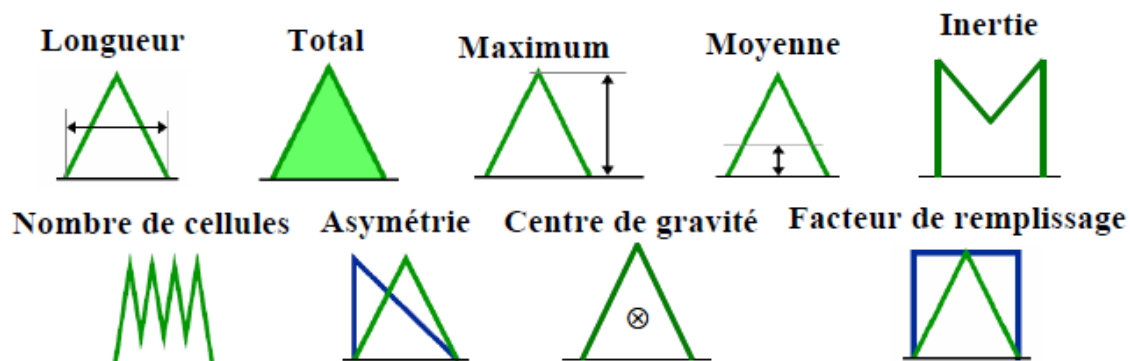


Figure 24 : Schéma des neuf attributs (longueur, total, maximum, moyenne, inertie, nombre de cellules, asymétrie, centre de gravité et facteur de remplissage) calculés par CytoClus<sup>®</sup> pour chacun des cinq signaux (FWS, SWS, FLR, FLO et FLY).

*Longueur* : la longueur brute est liée au temps de passage à mi-hauteur du signal caractéristique d'une particule donnée. Elle est ensuite corrigée par un abaque prenant en compte la largeur du faisceau laser.

*Total* : représente l'intégrale du signal (aire sous la courbe).

*Maximum* : valeur maximale mesurée du signal.

*Moyenne* : la moyenne est égale à l'intégrale du signal divisée par le nombre de points de mesure constituant le profil optique. La moyenne élimine l'effet de taille sur la mesure de la fluorescence totale.

*Inertie* : l'inertie est définie comme le second moment de la forme du profil optique.

*Centre de gravité* : le centre de gravité est obtenu en divisant le premier moment du profil optique par le total.

*Facteur de remplissage* : donne une indication sur la solidité du profil optique.

*Asymétrie* : donne une indication sur la distribution du signal le long de la particule.

*Nombre de cellules* : L'algorithme repère le changement de signe de la dérivée du profil optique. Pour un changement entre deux points formant le profil optique inférieur à 75% de la valeur maximale (*i.e.* le pic du signal), l'algorithme détecte deux cellules.

*Temps de passage* : durée de passage de la particule devant le laser (en ms).

### 5.1.2. La clusterisation

La méthode traditionnelle de classification des particules est la clusterisation manuelle. Les particules optiquement similaires vont former des amas et la délimitation de ces amas de particules les uns par rapport aux autres, forme donc des clusters. Dans le cas des cytomètres Cytobuoy<sup>®</sup>, cette clusterisation manuelle s'effectue via le logiciel CytoClus<sup>®</sup>. La caractérisation des groupes cytométriques s'effectue par des graphiques en deux dimensions appelés cytogrammes. Chaque axe de ces cytogrammes résulte de la combinaison entre un attribut calculé pour un signal. Il est également possible de choisir de représenter des ratios entre les configurations d'axes. Au total, la cytométrie de type "pulse shape-recording" permet d'obtenir un nombre maximum de :

$$[(5 \text{ signaux} * 9 \text{ attributs}) + \text{TOF}] * 2 = 92 \text{ combinaisons d'axes} \quad (3)$$

Plusieurs options sont proposées par CytoClus<sup>®</sup> pour le processus de délimitation (*i.e.* gating) des groupes cytométriques : rectangle, ellipse et polygone.

Très fréquemment, il est nécessaire lors du gating manuel, d'avoir recours à plusieurs cytogrammes. En effet, il est fréquent d'observer un groupe de particules optiquement similaires à partir de deux axes mais rigoureusement distinctes en utilisant d'autres combinaisons d'axes. Ces superpositions peuvent parfois être difficiles à discerner à l'œil nu notamment dans des échantillons avec un fort nombre d'événements. Une fois le processus de délimitation des clusters finalisé, l'opérateur peut exporter les résultats, où le fichier final comportera toutes les valeurs de chaque combinaison attributs-signaux par cluster ainsi que le nombre d'événements par cluster et le volume analysé pour cet échantillon. L'exportation des résultats se fait pour un fichier ou en « batch process ». Ce dernier mode permet d'automatiser le processus d'exportation des résultats à partir d'un gating de référence, ce qui le rend particulièrement utile pour les grands jeux de données. Cependant, la délimitation des clusters est alors identique entre les fichiers. Il est donc nécessaire de vérifier les fichiers manuellement, un par un et d'effectuer le « batch process » lorsque le gating n'est pas à redéfinir entre les fichiers. Dans le cas de changements de la composition cellulaire (spatiaux ou temporels) entre les fichiers, il faut redéfinir les limites entre les groupes.

Une caméra peut être associée à ces cytomètres automatisés, permettant ainsi de prendre des photographies des particules aux caractéristiques optiques définies au préalable dans une zone cible d'un cytogramme. Bien que la résolution de la caméra s'améliore sans cesse (0,75  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  avant 2016 ; 0,42  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  entre 2016 et 2017 et 0,3  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  après 2017, Artigas et al., 2019), elle ne permet toutefois d'obtenir des photographies nettes que pour le nanophytoplancton de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  et le microphytoplancton. A l'heure actuelle, la résolution de la caméra du CytoSense est identique à celle de l'IFCB et meilleure que celle du FlowCAM. En revanche le FlowCAM et l'IFCB permettent d'obtenir des images dont la taille est inférieure à 20  $\mu\text{m}$  (Tableau 1).

Tableau 1 : Résumé des principales spécifications techniques des appareils utilisant un système d'imagerie. Tiré du rapport JERICO-NEXT sur les nouvelles méthodes pour les observations automatisées in situ de la diversité phytoplanctonique (Karlson et al., 2017).

Instrument	Gamme de taille ( $\mu\text{m}$ )	Taille de l'image (pixels)	Resolution ( $\mu\text{m}/\text{pixel}$ )	Grossissement
<b>CytoSense (&lt; 2016)</b>	>20	1280x1024	0,75	x11
<b>CytoSense (2016-2017)</b>	>20	1280x1024	0,42	X11
<b>CytoSense (&gt; 2017)</b>	>20	1920x1200	0,3	x16
<b>FlowCAM</b>	<10 à 2000	1280x960	1,34/0,55	x4/x10/x20
<b>UVP5</b>	>600	2048x2048	n/a	n/a
<b>IFCB</b>	<10 à 150	1380x1034	0,3	x10

## 5.2. Clusterisation automatisée supervisée

La classification automatisée peut être réalisée grâce au package « RclusTool » pour R (Wacquet et al., 2020, *submitted*). Initialement, cet outil a été développé pour aider les cytométristes à la classification des données (Hébert et al., 2014). Cependant, l'outil finalisé se veut généraliste et permet de classer des données variées selon des méthodes supervisées (algorithmes « Random-Forrest », méthode des « k-plus proches voisins », « machine à vecteurs de support » et la « perception multicouche »), non-supervisées (algorithmes « K-means », « Spectral », « Classification hiérarchique », « partitionnement des K-médoïdes » et « Espérance-Maximisation ») ou semi-supervisées (algorithmes « Classification spectrale contrainte » et « K-means contraint ») via une interface graphique. Ce package écrit en R a été développé à l'origine par le LISIC en collaboration avec le LOG dans le cadre des projets INTERREG IV A « 2 mers » DYMAPHY<sup>5</sup>, JERICO-NEXT<sup>6</sup> et la convention n°2101893310 entre le Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire (MTES) et le CNRS INSU pour la mise en place de la Directive Cadre Stratégie sur le Milieu Marin (DCSMM -

<sup>5</sup> <http://www.DYMAPHY.eu/>

<sup>6</sup> <http://www.JERICO-ri.eu/>



2008/56/CE). Il est actuellement disponible sur Mawenzi<sup>7</sup>. Cet outil permet également la visualisation et l'exploration des données via une classification par une succession d'étapes : l'importation, le pré-traitement, la classification à proprement dite, soit non-supervisée, semi-supervisée ou supervisée et pour les grands jeux de données d'une même zone (et même période), un onglet « batch process ». Le pré-traitement permet la transformation, la création d'attributs et de signaux et de filtrer les plus pertinents et/ou redondants. Ensuite, la classification s'effectue à partir des attributs et des signaux sélectionnés lors de l'étape de pré-traitement. Elle permet d'explorer un hypervolume à  $n$  combinaisons où  $n$  est défini comme le nombre maximal de combinaisons possibles à partir des attributs et signaux retenus, tandis que le gating manuel est seulement limité à quelques combinaisons dont les plus pertinentes et les plus utilisées dans ce travail seront repris dans le tableau 2 et la figure 26 de la partie 5.4 *Les groupes cytométriques*.

### 5.3. Le contrôle qualité du cytomètre et des données

Avant le gating des échantillons, il est nécessaire de réaliser un contrôle qualité des données acquises. Ce contrôle qualité apparaît à plusieurs niveaux : soit concernant directement l'appareil, soit concernant les données générées. Régulièrement, après chaque grand déploiement sur le terrain ou chaque semaine, le liquide gaine doit être changé par de l'eau Milli-Q avec du biocide, pour limiter la précipitation de cristaux de sels et limiter le développement de bactéries dans les filtres. Par la suite, avant chaque nouvelle utilisation, le liquide gaine doit être remplacé par un fluide le plus proche possible du milieu à analyser afin de limiter la réfraction entre le liquide gaine et l'échantillon. Dans nos différents cas d'études, notre liquide gaine a été constitué par de l'eau de mer du milieu considéré, filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$ . La seconde étape du contrôle qualité est l'alignement du faisceau laser avec le centre de la cuvette. Lors de l'acquisition des mesures, l'ajout de billes fluorescentes permet de suivre la déviation de la taille et de la fluorescence des particules en fonction de la température du liquide gaine,

---

<sup>7</sup> <http://mawenzi.univ-littoral.fr/RclusTool/>

ce qui permet d'appliquer des correctifs sur ces paramètres à posteriori. Il est important de calibrer l'appareil régulièrement avec des billes car à tout moment les paramètres intrinsèques au capteur vont avoir une influence importante sur l'estimation de la taille : seuil de détection, sensibilité des photomultiplicateurs, température du liquide gaine, milieu analysé (eau douce/eau de mer). Les particules inférieures à 5  $\mu\text{m}$  (largeur du faisceau laser) vont voir leur taille surestimée par rapport à leur taille réelle. L'utilisation de billes de 3 et 10  $\mu\text{m}$  permet de corriger la taille de chaque particule selon la taille des billes passées dans le cytomètre et à partir de deux équations (eq. 4 et 5) établies par Bonato et al., (2015). Cette relation permet de corriger la taille des particules si la relation entre la taille réelle et la taille obtenue par le cytomètre suit une relation linéaire. Néanmoins, lors d'un stage de master 1 (Veillot, 2019) réalisé au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, l'étude de la relation entre taille estimée et taille réelle sur des sets de billes de différentes tailles via la théorie de Mie a montré que les tailles mesurées inférieures à 3  $\mu\text{m}$  sont surestimées, les tailles comprises entre 3 et 10  $\mu\text{m}$  sont bien estimées alors que les tailles mesurées supérieures à 10  $\mu\text{m}$  sont sous-estimées. Bien que non-utilisées ici, les futures analyses utilisant les mesures de la taille par la cytométrie en flux automatisée se doivent de considérer ce résultat.

$$\text{Facteur de correction} = \text{taille réelle des billes} / \text{taille mesurée des billes} \quad (4)$$

$$\text{Taille estimée des particules } (\mu\text{m}) = \text{taille mesurée des particules} \times \text{facteur de correction} \quad (5)$$

Le second contrôle qualité intervient une fois les échantillons analysés et repose sur la détection d'échantillons à données suspectes. Cette détection se fait via un contrôle du volume analysé ainsi que la concentration totale de particules pour chaque échantillon. Plusieurs cas sont alors observés :

- 1) Pour un faible volume analysé, l'échantillon comporte peu de particules. Lors des campagnes océanographiques, ce type d'échantillon correspond à un arrêt prématuré de l'analyse, par exemple lors d'une arrivée sur station. C'est ce que l'on peut observer pour les valeurs dont les

volumes analysés sont inférieurs à 1 mL de la figure 25A. Cette observation mène toujours à une sur-estimation de l'abondance des particules dans l'échantillon.

- 2) Pour un volume analysé important, l'échantillon peut avoir très peu de particules. Il est possible qu'un problème technique provenant de l'appareil survienne tel qu'un filtre ou un tuyau bouché. Cependant il se peut toutefois qu'aucun problème ne survienne et que l'échantillon soit effectivement très pauvre en particules. Ces mesures peuvent être mise en adéquation avec les mesures de pression différentielle pour vérifier ces hypothèses.

L'identification des échantillons suspects se fait alors par le calcul de la distance de Cook sur la totalité des échantillons. Cette méthode est adaptée pour la détection d'éléments suspects suivant un modèle non-linéaire (Riazoshams et al., 2019), ce qui est particulièrement le cas dans la relation volume analysé et abondance pour le CytoSense/CytoSub. Elle mesure l'impact que chaque point a sur la qualité du modèle de régression. Le principe repose sur la différence entre les coefficients calculés par la régression et les valeurs qui devraient être obtenues si l'observation correspondante avait été exclue de l'analyse. Les valeurs suspectes sont celles plus grandes que le seuil (Fig. 25B) défini par l'équation 6 (Hair et al., 1998) :

$$D = 4/(n - k + 1) \quad (6)$$

où  $n$  est le nombre d'observations et  $k$  le nombre de prédicteurs. Une fois les échantillons suspects identifiés, il convient d'observer individuellement les causes de ces écarts à la relation calculée.

La figure 25 est un exemple de ce contrôle qualité appliqué aux échantillons acquis par le cytomètre en flux lors de la campagne du MTW du Rijkswaterstaat (RWS, 15 au 18 mai 2017). Les volumes analysés lors de cette campagne sont compris entre 0,42 et 2,75 mL. La plupart des points de la relation  $\log_{10}$  du volume en fonction du  $\log_{10}$  des abondances se répartissent autour d'une polynomiale d'ordre 3 avec toutefois certains points s'écartant de cette relation (Fig. 25A). Ce sont ces points qui sont détectés comme suspects par la distance de Cook dont le seuil est représenté par la ligne pointillée

rouge (Fig. 25B) et dont les échantillons suspectés sont représentés par les points blancs sur les figures 25A et Fig.25B. Finalement, après observation individuelle des échantillons, seulement ceux ayant un volume proche de 1mL et en dessous de 1mL analysés représentent des échantillons tronqués car l'appareil a été arrêté avant la fin de la mesure.

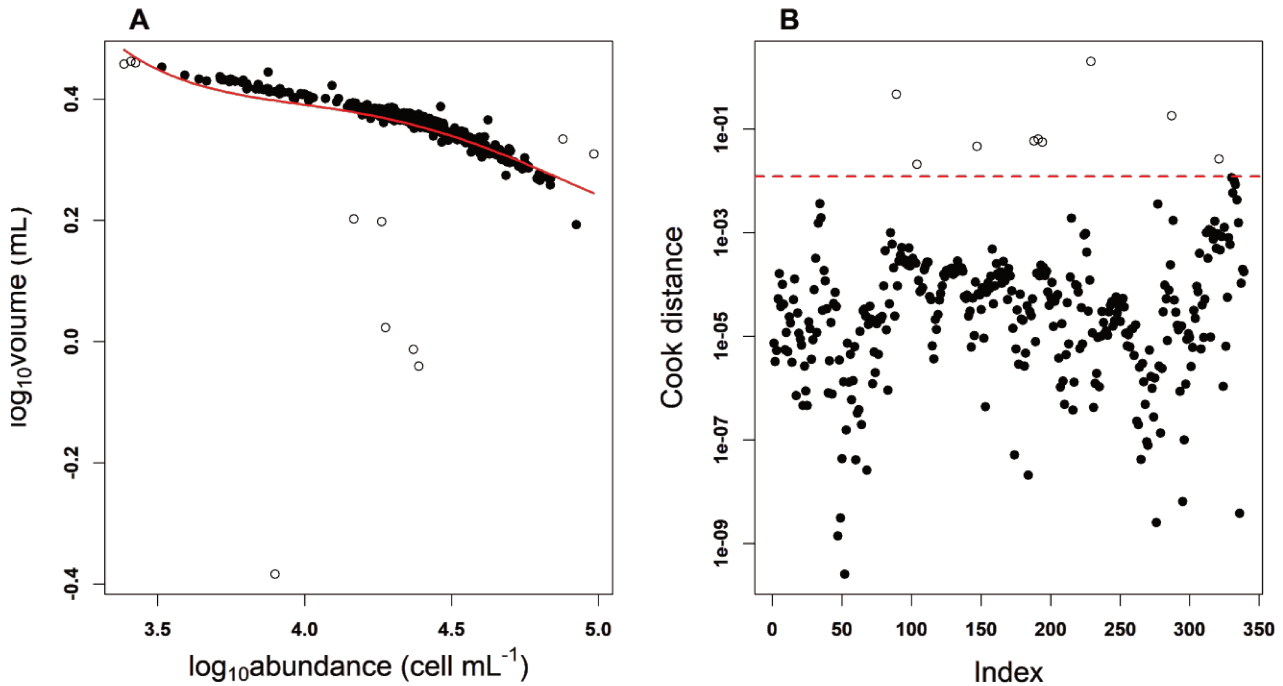


Figure 25 : Données de la campagne du Rijkswaterstaat A. Relation entre le logarithme du volume analysé (mL) et le logarithme de l'abondance ( $\text{cell.mL}^{-1}$ ) . B. Distance de Cook à partir des résidus. La ligne en pointillés rouges défini le seuil de suspicion. Sur les 2 graphiques, les points noirs représentent les échantillons où les résidus sont en-dessous du seuil de suspicion. Les points blancs représentent les échantillons où les résidus sont au-dessus du seuil de suspicion.

La seconde étape du contrôle qualité *a posteriori* se fait sur les fichiers « listmode » en sortie du cytomètre. Un fichier est alors généré par cluster et par échantillon. Il contient les informations de chaque signal et attribut pour chaque particule. Dans cette étape il s'agit de comparer le length SWS et length FWS. Etant très colinéaires, les deux paramètres doivent être quasi-identiques (ce qui montre un bon alignement du laser lors des acquisitions). Dans le cas contraire, il est nécessaire de revenir à CytoClus et d'observer l'empreinte optique de la particule concernée. Une faible colinéarité entre le length FWS et le length SWS ainsi qu'entre le FWS droit et le FWS gauche peut également révéler un

défaut dans l'alignement du laser. Toujours en utilisant ces « listmode », la troisième étape du contrôle qualité *a posteriori* repose sur la suppression des particules dont la taille est inférieure à la limite de détection du CytoSense/CytoSub. La limite de détection est identifiée par le length FWS et le length SWS dont chacun doit être supérieur à 0,2  $\mu\text{m}$ . Si les particules ont des valeurs inférieures ou égales à 0,2  $\mu\text{m}$ , elles sont automatiquement retirées du jeu de données. Ce processus s'effectuant pour chaque groupe et chaque échantillon, il est nécessaire d'automatiser les procédures via des environnements tels que R ou Matlab. Finalement, une fois les fichiers nettoyés, la taille de chaque particule est corrigée selon la taille des billes passées dans le cytomètre et à partir de deux équations d'estimation de la taille puis de la correction de la taille (Eq. 3 et 4) établies par Bonato et al., (2015). Toutefois, la taille corrigée est fortement dépendante du jeu de billes utilisées.

#### 5.4. Les groupes cytométriques

Le nombre d'études portant sur le CytoSense/CytoSub s'accroît d'année en année mais à l'heure actuelle, chaque étude utilise ses propres appellations. De ce fait, il y a un besoin d'harmonisation du vocabulaire pour fournir une base commune à la communauté scientifique utilisant le CytoSense/CytoSub. Dans ce sens, un effort considérable auprès de la communauté cytométrique a été réalisé dans le cadre du projet européen SeaDataNet coordonné par l'Institut Océanographique Méditerranéen de Marseille (MIO) qui a permis, après réalisation de sondages auprès d'une grande partie de la communauté d'utilisateurs, de définir un vocabulaire de base à utiliser rendu disponible sur SeaDataNet<sup>8</sup>. Les groupes définis dans ce vocabulaire et utilisés dans cette thèse sont : *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, Picophytoplancton eucaryote, Nanophytoplancton eucaryote, Cryptophytes, Coccolithophores, Microphytoplancton. Une description détaillée de ces groupes est fournie en annexe de ce travail de thèse (Annexe I). Ce travail de définition de vocabulaire commun

---

<sup>8</sup> [http://seadatanet.maris2.nl/v\\_bodc\\_vocab\\_v2/search.asp?lib=F02](http://seadatanet.maris2.nl/v_bodc_vocab_v2/search.asp?lib=F02)

est toujours en cours et devrait être finalisé prochainement. La suite de cette thèse utilise donc ce vocabulaire comme base mais une caractérisation de sous-groupes est toutefois possible.

Les combinaisons d'axes utilisées permettent de caractériser les groupes et sous-groupes fonctionnels phytoplanctoniques selon leurs traits cytométriques reliés à des critères apparentés à la morphologie et la physiologie (Pomati et al., 2013). Elles sont répertoriées dans le tableau 2. La combinaison 1 est la principale combinaison utilisée pour le gating manuel tandis que les combinaisons 2 et 3 sont utilisées pour la caractérisation des sous-groupes ou pour redéfinir plus précisément les groupes. En Manche/Mer du Nord, jusqu'à 11 groupes ont pu être caractérisés avec des niveaux taxinomiques différents. En Mer Baltique, jusqu'à 10 groupes ont pu être caractérisés. En Manche/Mer du Nord, la reconnaissance des groupes se base essentiellement sur les études antérieures (Bonato et al., 2016, 2015; Guiselin, 2010; Thyssen et al., 2015) permettant une reconnaissance à partir de la taille mais aussi des niveaux de fluorescence en fonction du type de fluorescence. La labellisation des groupes se fait premièrement selon la taille, se basant en partie sur la classification de Sieburth et al. (1978). En conséquence, le phytoplancton détecté par le CytoSense/CytoSub est sub-divisé en picophytoplancton (0,2 à 2-3  $\mu\text{m}$ ), nanophytoplancton (2-3 à 20  $\mu\text{m}$ ) et microphytoplancton (> 20  $\mu\text{m}$ ).

Tableau 2 : Combinaisons d'axes permettant de caractériser les groupes fonctionnels phytoplanctoniques et leur correspondance avec le vocabulaire disponible sur SeaDataNet. En noir, les groupes communs à la Mer Baltique et à la Manche/Mer du Nord. En bleu, les groupes uniquement caractérisés en Manche/Mer du Nord. En orange, les groupes uniquement caractérisés en Mer Baltique.

Groupe fonctionnel phytoplanctonique	Correspondance SeaDataNet	Combinaison 1	Combinaison 2	Combinaison 3
<i>Synechococcus</i> -like	<i>Synechococcus</i>	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ TFWS	vs $\frac{\text{Total FLY}}{\text{Total FLR}}$ $\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$	vs TFLR vs TFWS
PicoVeryLowFLR	Picophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
PicoLowFLR	Picophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
PicoHighFLR	Picophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
Cryptophytes-like (NanoLowORG)	Cryptophytes	$\frac{\text{Total FLY}}{\text{Total FLR}}$ $\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$	vs Max FLR vs Max FLO	
Cryptophytes-like (NanoHighORG)	Cryptophytes	$\frac{\text{Total FLY}}{\text{Total FLR}}$ $\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$	vs Max FLR vs Max FLO	
Coccolithophores-like (NanoSWS)	Coccolithophores	$\frac{\text{Total FLR}}{\text{Total FWS}}$ moyenne SWS	vs TFLR vs TSWS	
NanoLowFLR	Nanophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
NanoHighFLR	Nanophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
NanoVeryHighFLR	Nanophytoplancton eucaryote	TFLR vs TFWS	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ vs TFWS	
<i>Pseudo-nitzschia</i> -like	Microphytoplancton	TFLR longueur FWS	vs TFRL vs TFWS	

Microphytoplankton (MicroRED)	Microphytoplankton	TFLR longueur FWS	vs	TFLR vs TFLO
Microphytoplankton (MicroORG)	Microphytoplankton	$\frac{\text{Total FLO}}{\text{Total FLR}}$ TFWS	vs	TFLR vs TFWS

### *Picoplancton autotrophe*

Le picoplancton autotrophe est caractérisé par une taille entre 0,2 et 3  $\mu\text{m}$ , englobant les procaryotes, dont la taille est comprise entre 0,2 à 2-3  $\mu\text{m}$ , et les picoeucaryotes autotrophes dont la taille varie entre 0,2 et 3  $\mu\text{m}$  (Winder, 2009). L'utilisation de billes de 3  $\mu\text{m}$  permet la discrimination du picoplancton et du nanoplancton. Néanmoins, lors de divisions cellulaires, le picoplancton peut dépasser 3  $\mu\text{m}$  et atteindre une taille de 5  $\mu\text{m}$ . Quatre groupes picophytoplanktoniques sont caractérisés lors de ces travaux de thèse. Un groupe possède une taille estimée de 2-2,5  $\mu\text{m}$  avec une fluorescence orange associée à la phycoérythrine. Il présente également de faibles niveaux de fluorescence rouge donc de chlorophylle *a* ce qui le rend plus facilement discernable des picoeucaryotes autotrophes grâce à la combinaison d'axes TFLO/TFLR vs TFWS (Tableau 2). De par ses caractéristiques, ce groupe peut être nommé *Synechococcus*-like (Olson et al., 1988; Wood et al., 1985). Les trois autres groupes de picoeucaryotes sont de tailles légèrement plus importantes, estimées entre 2-3  $\mu\text{m}$ . Ils émettent une fluorescence rouge et leur labellisation se fait en fonction de ce niveau de fluorescence (Fig. 26). PicoVeryLowFLR fluoresce (en rouge) moins que PicoLowFLR qui à son tour fluoresce moins que PicoHighFLR. Ces groupes se caractérisent aisément via la combinaison TFLR/TFWS (Tableau 2).



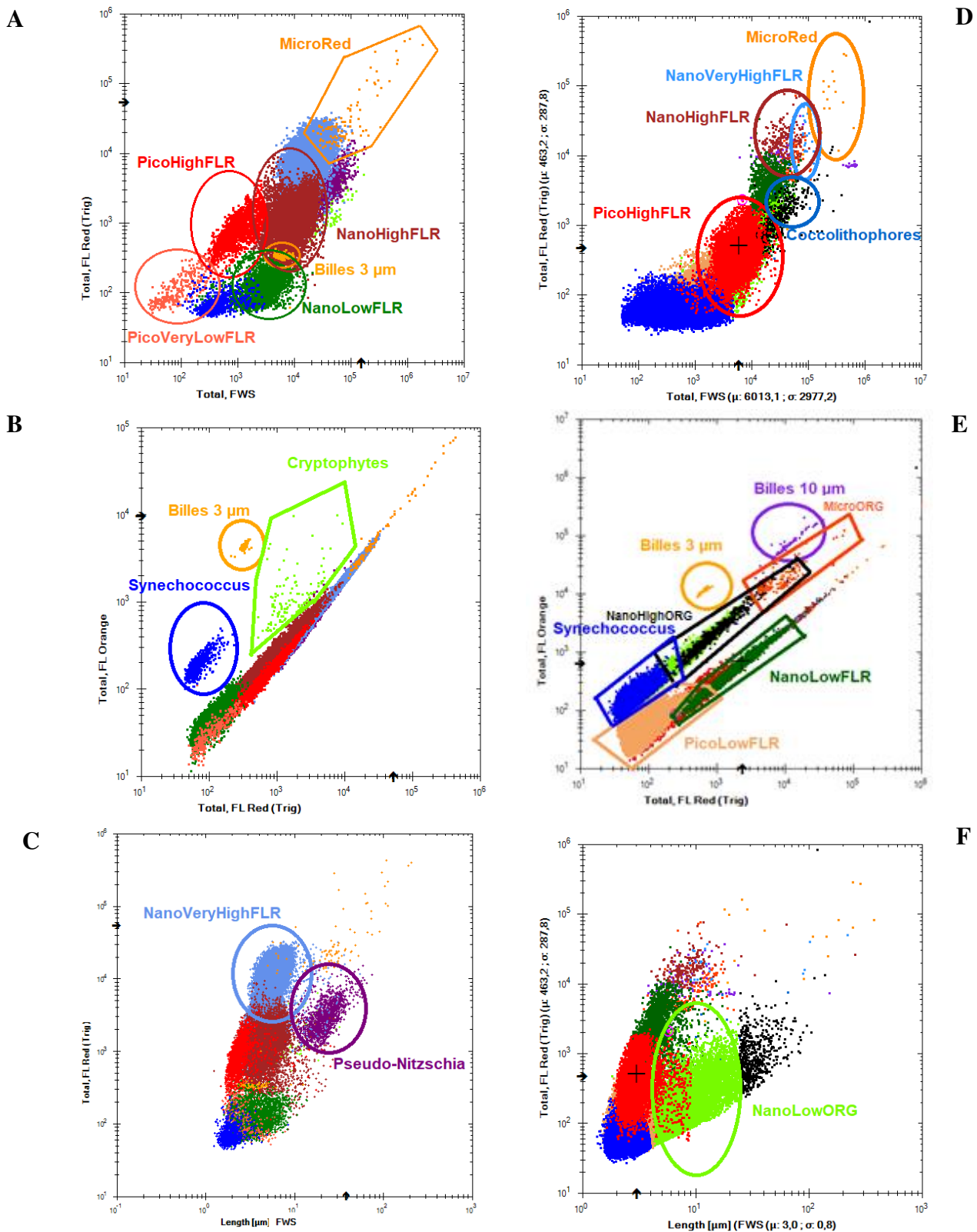


Figure 26 : Cytogrammes utilisés pour la caractérisation des groupes phytoplanctoniques fonctionnels en Manche/Mer du Nord (A, B, C) et Mer Baltique (D, E, F).

*Nanoplancton autotrophe*

Trois groupes de taille comprise entre 3 à 8  $\mu\text{m}$  et fluorescence rouge majoritaire (NanoFLR) appartenant aux nanoeucaryotes sont caractérisés en Manche/Mer du Nord au printemps. Leurs différenciations se fait également sur les niveaux plus ou moins élevés d'autofluorescence de la chlorophylle *a*. A cette époque de l'année, le genre *Phaeocystis* représente la plus grande partie du nanophytoplancton en Manche orientale (Houliez et al., 2012a). La relation a été testée entre ces 3 groupes cytométriques et les comptages au microscope de ces haptophytes ( $\rho = 0.75$ ,  $p < 0,001$ ) effectués par le Dr. Fernando Gómez pendant la campagne PHYCO (mai 2017). D'après des travaux antérieurs réalisés en cytométrie en flux conventionnelle (Rutten et al., 2005) et de type "pulse shape-recording" (Bonato et al., 2016, 2015; Guiselin, 2010), ces trois groupes peuvent être assimilés aux trois stades libres de *Phaeocystis globosa*. NanoLowFLR et NanoHighFLR seraient la forme haploïde de cellules libres tandis que NanoVeryHighFLR, due à sa taille plus grande que les autres groupes et à l'autofluorescence de la chlorophylle *a* plus importante, correspondrait à la forme diploïde de cellules libres (Bonato et al., 2016, 2015). Cependant, à d'autres périodes et dans d'autres zones d'études (comme en Mer Baltique), ces trois groupes nanophytoplanctoniques ne correspondraient pas nécessairement au genre *Phaeocystis globosa*. En Mer Baltique, le nanophytoplancton peut être caractérisé par l'haptophyte mixotrophique *Prymnesium parvum* ou *P. polylepis* pouvant former des efflorescences toxiques (e.g. Fistarol and Legrand, 2003; Larsson et al., 2014). Un quatrième groupe de taille et de fluorescence rouge similaires au groupe NanoVeryHighFLR est caractérisé. Cependant, les cellules de ce groupe sont caractérisées par un sideward scatter plus important (NanoSWS) que pour les autres groupes ce qui permet une discrimination plus facile à partir de la combinaison d'axes TFLR/TFWS et Maximum SWS. Ceci indique une structure externe plus complexe que celle des autres groupes et dont les cellules sont sans doute composées de coccolithes, des plaques de carbonate de calcium qui dévie fortement la lumière aux grands angles. Ce groupe est ainsi nommé

Coccolithophores-like (Von Dassow et al., 2012). Bien que très minoritaires, certains dinoflagellés pourraient aussi être présents dans ce groupe dû à la présence de plaques calcifiées (Olson et al., 1989).

Les groupes NanoLowORG and NanoHighORG sont formés de cellules dont le ratio FLO/FLR est identique à celui de *Synechococcus* bien que le FLR et le FLO par cellule soient plus importants (Fig. 26). Le signal du FWS est également plus important que chez *Synechococcus*. En Manche/Mer du Nord, un seul groupe est généralement caractérisé (noté NanoORG) tandis qu'en Mer Baltique, les deux groupes sont observés. Ce fort niveau de fluorescence orange indique que les cellules contiennent de la phycoérythrine et peut être de la phycocyanine. Ces groupes sont très facilement caractérisables en utilisant les ratios de fluorescence, TFLY/TFLR sur TFLO/TFLR (Tableau 2). Ces groupes pourraient correspondre à des cyanobactéries en division ainsi que des cryptophytes ou des rhodophytes. Dans les chapitres 3 et 4 ces groupes seront nommés « Cryptophytes-like » tandis que dans le chapitre 5, ces groupes seront nommés « NanoLowORG » et « NanoHighORG » puisque des petites colonies de cyanobactéries comme des Chroococcales ainsi que des Cryptophytes peuvent former ces groupes.

### *Microphytoplankton*

Le length du FWS à 20  $\mu\text{m}$  permet de fixer la limite de détection entre le nanophytoplankton et le microphytoplankton. Trois sous-groupes microphytoplanktoniques ont été caractérisés durant les études menées au cours de cette thèse de doctorat. Dans les deux derniers groupes décrits, les comptages sont très souvent peu significatifs car le nombre d'événements détectés est faible. Le premier groupe est représenté par des particules de petite taille, dépassant sensiblement les 20  $\mu\text{m}$  sous leur forme cellule seule. Chaque cellule de ce groupe possède deux chloroplastes symétriques. Ce pattern symétrique observé sur le profil optique (ou pulse shape) pour une particule peut également être répété signifiant que ces cellules peuvent être observées à la fois sous forme de cellules seules ou en colonies. Elles sont facilement discernables grâce à la combinaison TFLR vs longueur du FWS

(Tableau 2). L'utilisation d'images obtenues par le cytomètre ainsi que l'association du profil optique permet de labelliser ce groupe comme des colonies appartenant au genre *Pseudo-nitzschia*-like (Fig. 27).

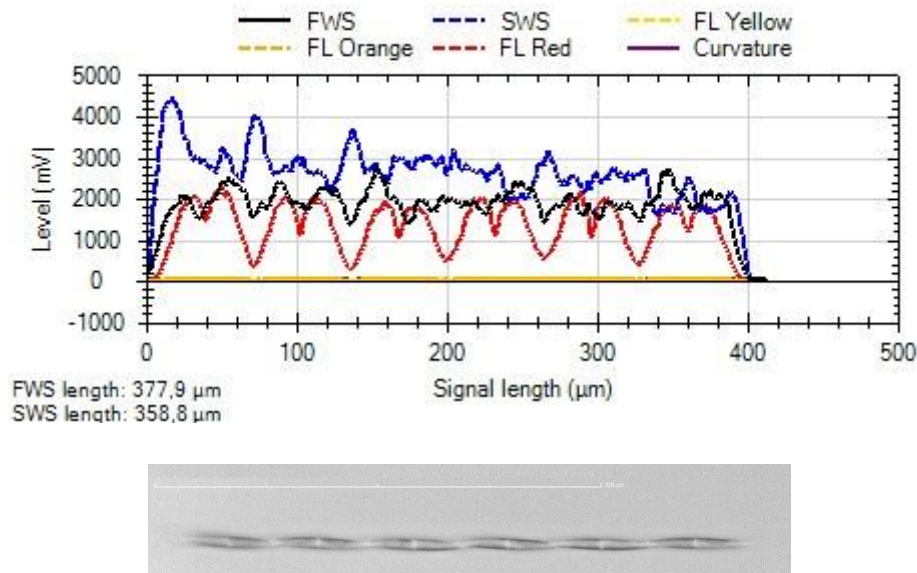


Figure 27 : Profil optique d'une colonie de cellules du genre *Pseudo-nitzschia* et son image associée (campagne PHYCO, prise le 29/04/2017 à la station PHY40 située en face de l'estuaire de la Somme).

Le second groupe microphytonctonique caractérisé groupe c'est le groupe « MicroRED ». Il est constitué de particules, cellules seules et colonies, dont la taille est supérieure à 20  $\mu\text{m}$ . Les niveaux de FWS et FLR des particules qui composent ce groupe sont bien plus élevés que chez les autres groupes, ce qui les rend aisément discernables (Fig. 26). Par conséquent, la combinaison d'axes utilisés pour le caractériser est TFWS vs Length FLR. Il s'agit d'un groupe polyphylétique dans lequel on retrouve des organismes avec une composition pigmentaire similaire (diatomées et dinoflagellés), des prédateurs comme certains ciliés et parfois des Haptophytes sous leur forme coloniale (*e.g. P. globosa*; *e.g. Guiselin, 2010; Houliez et al., 2012; Monchy et al., 2012*).

Le dernier groupe caractérisé est « MicroORG ». Les particules observées dans ce groupe sont de même taille que celles du groupe « MicroRED » et sont quasi-exclusivement sous forme coloniales. Tout comme les groupes NanoLowORG et NanoHighORG, le profil optique des particules montre la

présence d'une fluorescence orange (FLO) et fluorescence jaune (FLY) plus élevées que chez le groupe « MicroRED » (Fig. 26). Ces fluorescences orange et jaune résultent de l'excitation des phycobilines (Li and Dickie, 2001; Wright et al., 2005). A l'inverse, la fluorescence rouge, correspondant à l'autofluorescence de la chlorophylle *a* est très faible par rapport à la fluorescence orange, ce qui indique un fort ratio FLO/FLR. Cette réponse pigmentaire est typique des cryptophytes et surtout des cyanobactéries où les phycobilines permettent de capter la lumière par le photosystème II (Bryant et al., 1987) alors que la chlorophylle *a* est essentiellement située dans le photosystème I et fluoresce très peu (Campbell et al., 1998). Par conséquent, il est aisé de caractériser le groupe « MicroORG » du groupe « MicroRED » via la combinaison d'axes TFLO/TFLR vs. TFWS (tableau 2). Le groupe « MicroORG » étant uniquement rencontré en Mer Baltique, il correspondrait à des cyanobactéries sous forme coloniale et engloberait potentiellement les genres *Aphanizomenon* spp., *Dolichospermum* spp. et *Nodularia* spp, d'après les observations et comptages réalisés par le Dr. Sirpa Lehtinen.

Lors des études de cette thèse, le groupe « MicroRED » est appelé « Microphytoplancton » en Manche/Mer du Nord car le groupe « MicroORG » n'y est pas caractérisé. Les appellations « MicroRED » (englobe les diatomées et les dinoflagellés autotrophes microphytoplanctoniques ainsi que les colonies de *Phaeocystis globosa* en Manche-Mer du Nord) et « MicroORG » (colonies de cyanobactéries, dinoflagellés à phycoérythrine) sont donc propres à la Mer Baltique.

### 5.5. Les traits morpho-physiologiques dérivés des traits optiques

Les combinaisons signaux-attributs renvoient aux propriétés optiques de particules. Les combinaisons les plus pertinentes permettent d'établir des proxy physiologiques et morphologiques pour chaque particule ou au niveau d'un cluster. Ainsi, ces combinaisons signaux-attributs les plus pertinentes définissent des traits cytométriques. Ces traits vont concerner le niveau individuel (*i.e.* particule) et « populationnel » (*i.e.* cluster cytométrique) mais on peut également définir des traits à l'échelle de la communauté (Violle et al., 2007) et sont repris dans le tableau 3. Quatorze traits au niveau individuel ont été définis lors d'études précédentes sur différents systèmes aquatiques : la taille, la forme, le

nombre de cellule dans une chaîne, la longueur de la courbure, la répartition de chlorophylle *a*, la répartition de phycoérythrine, la répartition de la phycocyanine et des pigments dégradés, l'asymétrie, le ratio Chlorophylle *a*/Phycoérythrine, le ratio Chlorophylle *a*/Volume, la composition interne/externe, proxy de biomasse par particule, concentration en phycoérythrine par particule, concentration en phéopigments par particule (Fontana et al., 2018; Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013). De plus, il est possible de mesurer 4 caractéristiques au niveau populationnel : abondance, fluorescence rouge par cluster, fluorescence orange par cluster, fluorescence jaune par cluster (Bonato et al., 2015; Louchart et al., 2020). Parmi les traits au niveau individuel, 6 sont liés à la morphologie des particules et 8 sont liés à la physiologie des particules. Deux traits morphologiques utilisés dans l'étude de Fragoso et al., (2019) n'ont pas été utilisés ici (la longueur de la courbure et le nombre de cellules) puisque les chaînes et colonies sont impactées par la profondeur de l'échantillon ce qui peut masquer les cellules dans une colonie, ils sont toutefois notés dans le tableau 3. Les traits liés à la morphologie sont la taille et la forme. La taille est considérée comme le trait le plus important en écologie du phytoplancton puisqu'il gouverne beaucoup de processus métaboliques et qu'il façonne d'autres traits (e.g. Marañón, 2015 ; Finkel et al., 2010 ; Litchman, Klausmeier, 2008). Dans le cas de la cytométrie en flux automatisée, la taille estimée d'une particule est donnée par le length FWS (Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013). D'autres traits découlent de la taille mais sont estimés par unité de volume (attribut « total » correspondant à l'intégrale d'un signal) comme le ratio de chlorophylle *a* estimée par unité de volume ( $Total\ FLR/Total\ FWS$ ) et le ratio de pigments accessoires par rapport à la chlorophylle *a*, ce par unité de volume [ $(Total\ FLO/Total\ FLR)/Total\ FWS$ ] tout deux définis par Fragoso et al. (2019) comme correspondant à des traits physiologiques. L'asymétrie du FWS donne une estimation de la complexité de la forme d'une particule (0 pour une représentation sous forme de Gaussienne à 1 pour une structure complexe, sans symétrie) et l'opposé du facteur de remplissage (1-Fill factor FWS) donne la diversité des formes (un indice le plus proche de 0 indique une particule parfaitement sphérique). Ces traits sont

également définis par Fragoso et al. (2019). Le SWS indique la déviation de la lumière. Il révèle alors la structure interne (richesse en organite, taille des vacuoles) et/ou externe comme les coccolithes chez les coccolithophorides (Olson et al., 1989), l'épaisseur du frustule chez les diatomées (Moutier et al., 2017, 2016) et dans de rares observations, la calcification chez certains dinoflagellés (Von Dassow et al., 2012) et peut être utilisé pour déterminer le biovolume (Haraguchi et al., 2017). La seconde catégorie de traits optiques concerne les traits physiologiques. On a l'intensité moyenne de fluorescence rouge par particule (Mean Total FLR), l'intensité moyenne de fluorescence orange par particule (Mean Total FLO) et l'intensité moyenne de fluorescence jaune par particule (Mean Total FLY). Ces traits représentent la concentration moyenne en pigment dans les particules (Louchart et al., 2020). La distribution des pigments contenus dans les particules est estimée grâce au facteur de remplissage. Il est possible d'en établir un par signal de fluorescence : Fill FLR pour la distribution de la chlorophylle *a*, Fill FLO pour la distribution de la phycoérythrine et de la phycocyanine et Fill FLY pour la distribution des pigments de dégradation de la chlorophylle *a* (Pomati et al., 2013). Il convient toutefois de noter que certains traits peuvent être fortement colinéaires et bien qu'ils soient mentionnés ici, leur colinéarité indique une redondance écologique. De ce fait, dans ces travaux de doctorat ils seront supprimés pour des valeurs de colinéarité supérieure à 0,9 (*e.g.* forte colinéarité entre le TFLO et TFLY). Il convient de préciser que le déclenchement du seuil de détection sur la fluorescence rouge sous-estime légèrement le niveau de fluorescence rouge ce qui par conséquent impacte légèrement les valeurs de traits dépendant de la mesure de la fluorescence rouge.

Tableau 3 : Liste des traits cytométriques (combinaison entre un attribut et un signal, parfois rapport entre des combinaisons attributs-signaux) servant à caractériser les groupes fonctionnels cytométriques avec leur signification technique, leur correspondance écologique ainsi que leur niveau d'application. Les signaux utilisés sont FWS pour le forward scatter, SWS pour le sideward scatter, FLR, FLO et FLY respectivement pour la fluorescence rouge, orange et jaune. Tableau tirée de Fragoso et al. (2019).

Trait cytométrique	Signification technique	Trait écologique	Niveau d'application	Références
Longueur FWS	Taille estimée de la particule	Taille	Individuel	Pomati et al., (2013) Fragoso et al., (2019)
1 - Facteur de remplissage FWS		Forme (Sphère)	Individuel	Fragoso et al., (2019)
Facteur de remplissage FLR		Répartition de chlorophylle <i>a</i>	Individuel	Pomati et al., (2013)
Facteur de remplissage FLO		Répartition des phycoérythrine	Individuel	Pomati et al., (2013)
Facteur de remplissage FLY		Répartition des pigments dégradés	Individuel	Pomati et al., (2013)
Asymétrie FWS		Asymétrie	Individuel	Fragoso et al., (2019)
$\frac{(\text{Total FLO})}{(\text{Total FLR})}$ Total FWS	Rapport entre l'intégrale du FLO et l'intégrale du FLR par volume	Phycoérythrine/Chl <i>a</i>	Individuel	Fragoso et al., (2019)



<b><math>\frac{\text{Total FLR}}{\text{Total FWS}}</math></b>	Rapport entre l'intégrale du FLR et le volume	Chl <i>a</i> /volume	Individuel	Fragoso et al., (2019)
Maximum SWS	Valeur maximale du SWS	Composition interne/externe	Individuel	Fragoso et al., (2019)
FWS Nombre de cellules	Estimation du nombre de pics dans le profil d'une chaîne	Nombre de cellule par chaîne	Individuel	Fragoso et al., (2019)
Longueur de la courbure	Déviation du signal par rapport au plan focal	Chaîne/colonie	Individuel	Fragoso et al., (2019)
Moyenne Total FLR	Valeur moyenne de l'intégrale du FLR par particule	Proxy de biomasse par particule	Individuel	Louchart et al., (2020)
Moyenne Total FLO	Valeur moyenne de l'intégrale du FLO par particule	Concentration en phycoérythrine par particule	Individuel	Louchart et al., (2020)
Moyenne Total FLY	Valeur moyenne de l'intégrale du FLY par particule	Concentration en phéopigments par particule	Individuel	Louchart et al., (2020)
Total FLR	Produit de la moyenne du Total FLR et l'abondance pour un cluster	Biomasse par cluster	Population	Bonato et al., (2015) Louchart et al., (2020)

Total FLO	Produit de la moyenne du Total FLO et l'abondance pour un cluster	Concentration phycoérythrine	totale	en	Population	Louchart et al., (2020)
Total FLY	Produit de la moyenne du Total FLY et l'abondance pour un cluster	Concentration phycocyanine dégradés	totale	et pigments	Population	Louchart et al., (2020)
Abondance	Concentration de particules ou cellules par millilitres ou litres, par cluster	Abondance			Population	Louchart et al., (2020)

## 6. Comparaison des méthodes d'analyse

### 6.1. Inter-comparaison de trois cytomètres automatisés

*Cette section fait l'objet d'une publication en co-auteur re-soumise après révision à Limnology and Oceanography : Methods dont les auteurs sont Reinhoud de Blok, Machteld Rijkeboer, Elisabeth Debusschere, Jonas Mortelamans, Koen Sabbe, Klaas Deneudt, Luis Felipe Artigas et Wim Vyverman.*

L'utilisation de la cytométrie automatisée de type « pulse shape-recording » (CytoSense/CytoSub) en tant que méthode innovante a été largement documentée pour le suivi des communautés phytoplanctoniques (Bonato et al., 2016, 2015; Thyssen et al., 2008b, 2008a), pour déterminer les propriétés optiques des particules dans l'eau (Agagliate et al., 2018; Moutier et al., 2017) ou encore l'étude des caractéristiques individuelles (Fontana et al., 2018, 2016, 2014; Pomati et al., 2013) ou communautaires (Breton et al., 2017; Fragoso et al., 2019) du phytoplancton. Etant une méthode innovante, plusieurs comparaisons avec des techniques d'observation et de suivis de référence ont été réalisées. Ainsi des intercomparaisons ont eu lieu avec la cytométrie conventionnelle (Thyssen et al., 2014b) et avec la microscopie (Haraguchi et al., 2017). S'imposant comme une méthode fiable et robuste pour les analyses *in vivo* à petites échelles, la cytométrie automatisée a aussi permis de caractériser les groupes phytoplanctoniques responsables des anomalies de rayonnement détectés par mesures satellitaires via l'algorithme PHYSAT (Thyssen et al., 2015). Néanmoins, les résultats provenant de la cytométrie de type « pulse shape-recording » demeurent dépendants de la configuration des capteurs et des protocoles de mesure (Artigas et al., 2019). Par conséquent, les comparaisons de résultats, entre et au sein des campagnes, nécessitent des connaissances approfondies pour comprendre les effets des différentes configurations et protocoles dans la détection des groupes phytoplanctoniques. Une intercomparaison entre trois cytomètres en flux automatisés (VLIZ, RWS, CNRS-LOG) de type « pulse shape-recording » a été réalisée pour déterminer l'effet des paramètres appliqués aux mesures en continu lors d'une campagne

océanographique (LifeWatch-VLIZ, 08 au 12 mai 2017). Ce travail d'intercomparaison a été mené par Reinhoud de Blok (Analyses statistiques, discussions Université de Gand, Institut Flamand pour la Mer), Machteld Rijkeboer (analyses sur le terrain, discussions, gating, Rijkswaterstaat) et Arnaud Louchart (analyses sur le terrain, discussions) et est en cours de re-soumission après une première révision.

Les trois cytomètres embarqués lors de la campagne LifeWatch-VLIZ présentent des configurations différentes en terme du nombre de lasers, de leur bande d'émission et de leur puissance (Tab. 1-3). Ils sont tous équipés d'un laser à 488nm (Sapphire, Coherent Inc.) qui excite la chlorophylle *a* par résonance. Le CytoSense du VLIZ possède un second laser (635nm, Coherent Inc.) pour exciter dans le second pic de la chlorophylle *a*. Le CytoSense du RWS possède, en revanche, un second laser (552nm, Coherent Inc.) pour exciter la phycoérythrine et la phycocyanine. Chaque expert utilise ensuite son propre protocole couramment utilisé lors de campagnes océanographiques sur le site d'étude. Les seuils de détection et d'enregistrement sont établis selon la taille (RWS, VLIZ ; *e.g.* Moutier et al., 2017; Pomati et al., 2011) ou selon le niveau de fluorescence rouge (CNRS-LOG ; Bonato et al., 2015; Thyssen et al., 2014b). A ce seuil de détection sur la taille qui permet de limiter le bruit mécanique, le RWS et le VLIZ utilisent un « smart trigger » (trigger automatisé) pour séparer le phytoplancton des particules non fluorescentes. Le seuil de détection sur la fluorescence rouge permet de discriminer les particules non fluorescentes du phytoplancton. Le « smart trigger » n'influence pas les mesures sur les signaux. Il permet uniquement de fixer un seuil à partir duquel les particules sont enregistrées.

Les fichiers sont premièrement nettoyés pour éliminer les particules non-fluorescentes restantes du phytoplancton via le logiciel CytoClus 3. Les échantillons sont ensuite classifiés avec le logiciel Easyclus (Thomas Rutten Projects, Pays-Bas) par le même expert (Machteld Rijkeboer) afin d'éviter les biais de « l'opérateur-dépendance » du gating manuel (chapitre 2, partie 4.4.2).

Cinq groupes phytoplanctoniques sont caractérisés pour chaque cytomètre et correspondent aux principaux groupes caractérisés en cytométrie en flux : Pico-Red, Pico-Synecho, Nano-Red, Nano-Crypto et Micro-Red dont la nomenclature SeatDataNet<sup>9</sup> est respectivement picophytoplancton eucaryote, *Synechococcus*, nanophytoplancton eucaryote, Cryptophytes et Microphytoplancton. La comparaison entre cytomètres montre une détection similaire pour le Pico-Red, Nano-Red et Micro-Red (Figure 28). Les coefficients des rangs de Spearman (Tableau 4) montrent également cette tendance. En effet, les corrélations sont très élevées et significatives pour ces quatre groupes ( $\rho = 0,82$ ,  $p < 0,001$  à  $\rho = 0,96$ ,  $p < 0,001$ ). A l'inverse, les abondances détectées par les trois cytomètres sont très différentes pour les groupes Pico-Synecho et Nano-Crypto. Ces observations sont corroborées par le rang de Spearman dont les valeurs sont plus faibles que pour les autres groupes ( $\rho = 0,60$ ,  $p < 0,001$  à  $\rho = 0,92$ ,  $p < 0,001$ ).

---

<sup>9</sup> [http://seadatanet.maris2.nl/v\\_bodc\\_vocab\\_v2/search.asp?lib=F02](http://seadatanet.maris2.nl/v_bodc_vocab_v2/search.asp?lib=F02)

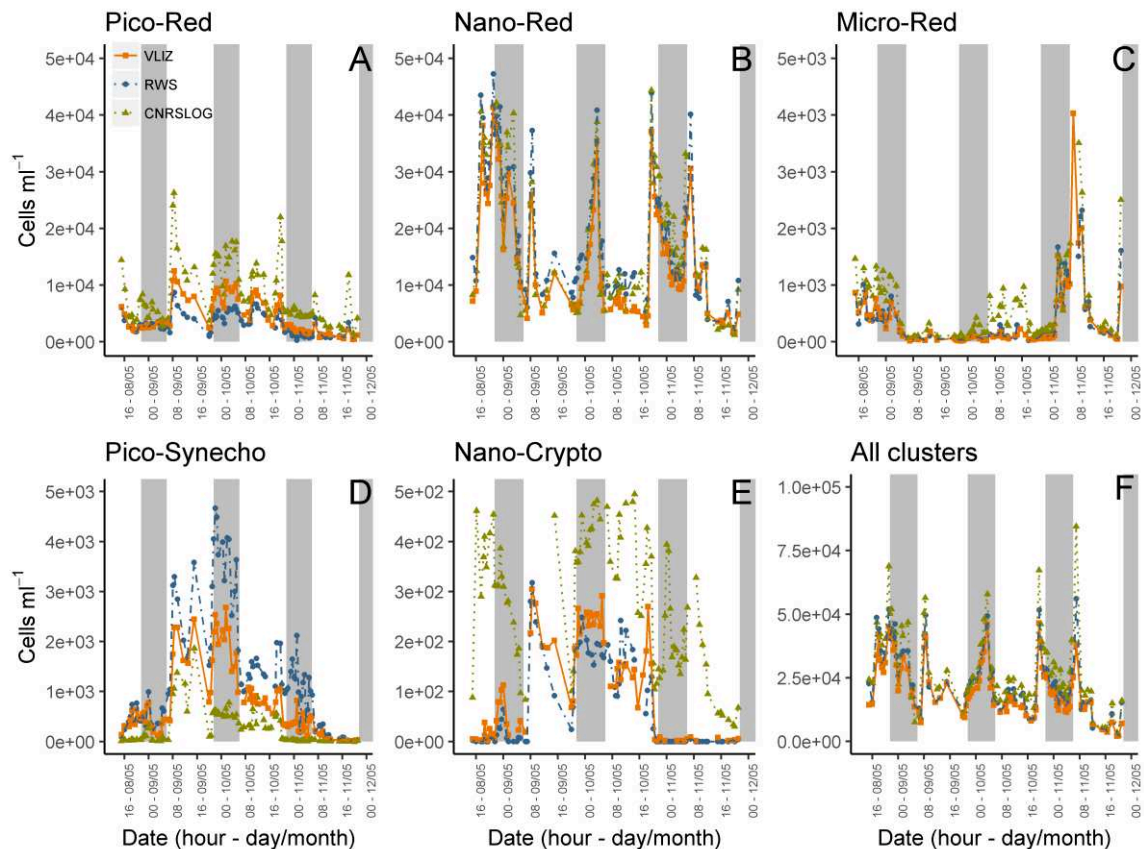


Figure 28 : Abondance (cell.mL-1) des cinq groupes phytoplanctoniques définie lors de la campagne LifeWatch-VLIZ. A) Pico-Red, B) Nano-Red, C) Micro-Red, D) Pico-Synecho, E) Nano-Crypto, F) Abondance totale phytoplanctonique. L'alternance entre les bandes sombres et claires indique l'alternance jour-nuit.

Le CytoSense du RWS a tendance à détecter plus de Pico-Synecho que le CytoSense du VLIZ qui lui-même a tendance à détecter plus de Pico-Synecho que le CytoSense du CNRS-LOG. La tendance inverse est observée pour le Nano-Crypto. Le CytoSense du CNRS-LOG a tendance à détecter plus de Nano-Crypto que le CytoSense du VLIZ qui lui-même a tendance à détecter plus de Nano-Crypto que le CytoSense du RWS. Ces différences seraient dues à des différences entre les configurations et protocoles choisis pour les différents appareils. La différence dans les triggers level, celui du CNRS-LOG pouvant être trop haut, omettant une partie du Pico-Synecho et du Pico-Red. Il faut aussi considérer la sensibilité des lasers du RWS qui permet de détecter des particules avec une faible fluorescence, potentiellement non détectées par les autres

cytomètres, les lasers à 552nm et 635nm permettant de mieux discriminer les particules possédant de la phycoérythrine. Ce qui expliquerait pourquoi le CytoSense du RWS détecte plus de Pico-Synecho que le CytoSense du VLIZ qui lui-même détecte plus de Pico-Synecho que celui du CNRS-LOG. En revanche, cette explication va à l'encontre de l'observation faite chez Nano-Crypto. Dans ce cas, les temps d'analyse différents (4 minutes de différence entre les protocoles du CNRS-LOG et du RWS et du VLIZ) avec un passage plus rapide des particules permet d'augmenter le nombre d'observations des événements étant considéré comme les moins bien représentés, ce qui le cas chez Nano-Crypto. Par conséquent, ces critères font que le CytoSense du CNRS-LOG aurait pu également détecter plus de Nano-Crypto que les autres cytomètres en flux.

Tableau 4 : Configuration des trois cytomètres automatisés et des protocoles utilisés lors de la campagne LifeWatch-VLIZ (08 au 12 mai 2017).

	<b>RWS</b>	<b>VLIZ</b>	<b>CNRS-LOG</b>
<b>Configuration</b>			
Laser 488nm	60mW	50mW	50mW
Laser 552nm	60mW		
Laser 635nm		50mW	
Sensibilité PMT H/L	X		
<b>Protocole</b>			
Vitesse d'échantillonnage	2,1 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$	2,1 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$	5,04 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
Durée totale d'analyse (vidange + durée réelle de l'analyse)	6 min	6 min	10 min
Seuil de détection	SWS : 15 mV	SWS : 29 mV	FLR : 13 mV
Smart trigger	FLR : 6 mV	FLR : 6 mV	

Bien que les trois cytomètres analysent en parallèle, la fréquence d'échantillonnage est différente (correspond à la durée totale d'analyse à savoir, l'analyse de l'échantillon et la vidange). Alors que les CytoSense du VLIZ et du RWS sont paramétrés pour prélever un échantillon toutes les 6 minutes, celui du CNRS-LOG prélève un échantillon toutes les 10

minutes (tableau 4), créant ainsi une différence de 4 minutes entre les deux protocoles. Ce décalage temporel est traduit par un décalage spatial de 1,48 km lorsque le navire se déplace à 12 nœuds. Par conséquent, il est parfois possible d'observer des variations dans le calcul des abondances. La configuration des cytomètres va également influencer la caractérisation de certains groupes. Le laser à 552 nm équipant le CytoSense du RWS permet une meilleure excitation de la phycoérythrine, ceci se traduisant par une meilleure caractérisation des Pico-Synecho détectés par le cytomètre de cet institut. Le passage des échantillons avec une vitesse d'échantillonnage plus faible diminue la puissance statistique et la représentativité des événements rares. Dans le cas de cette étude, le RWS et VLIZ enregistrent moins de particules dans le groupe Micro-Red que le CNRS-LOG car le protocole enregistre plus longtemps et les particules passent plus rapidement permettant au CytoSense du CNRS-LOG une meilleure détection des événements rares (Thyssen et al., 2008b).

L'utilisation de seuils de détection sur la taille et la fluorescence peut également induire des différences dans les comptages. En effet, en augmentant le seuil de détection sur la taille, ce dernier va diminuer la section du profil optique enregistré (Figure 29). La longueur est définie à partir de la section à mi-hauteur puis corrigée par une formule donnée par le constructeur, le tout est alors influencé par la section de base. Par conséquent, la taille des particules est altérée, surtout pour les particules de petite taille dont la section à mi-hauteur va grandement varier pour un faible changement de seuil de détection. Ceci peut expliquer des erreurs d'attributions des particules entre les groupes cytométriques, entre les CytoSense du VLIZ et du RWS, en attribuant des particules au mauvais groupe. Néanmoins, ces différences semblent être minimales puisque les abondances sont similaires, surtout chez les groupes Pico-Red, Nano-Red et Micro-Red. Enfin, l'application d'un seuil de détection sur la taille et un faible « smart trigger » sur la fluorescence rouge donnent des résultats identiques aux échantillons où un seul seuil de détection modéré est appliqué sur la fluorescence rouge puisque les dynamiques globales de



chaque groupe caractérisé par les trois cytomètres sont identiques sauf chez Pico-Synecho et Nano-Crypto où ces différences ont été expliquées précédemment.

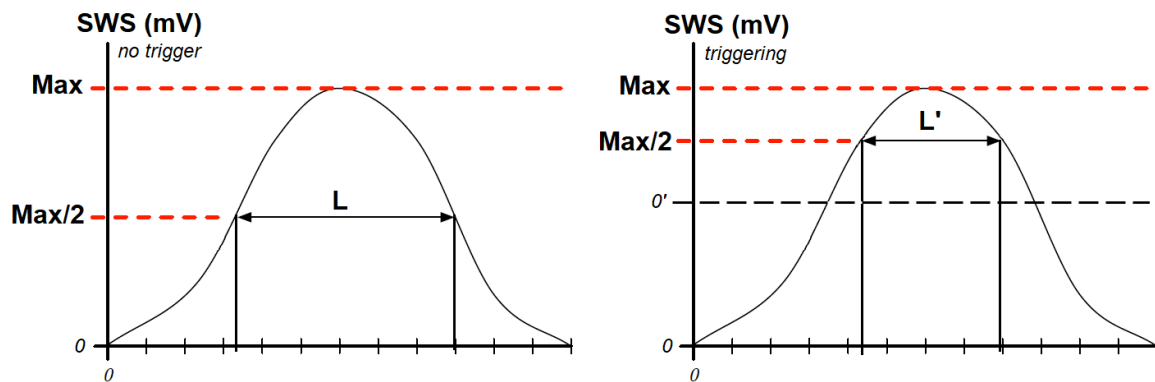


Figure 29 : Influence du seuil de détection appliqué sur le sideward scatter (SWS) sur l'estimation de la longueur de la particule (L et L'). Le SWS et le FWS scatter étant colinéaires pour ce qui est de la longueur. Aucun seuil de détection n'est appliqué sur la figure de gauche tandis qu'un seuil de détection est appliqué sur la figure de droite.

## 6.2. Inter-comparaison des méthodologies de classification (manuelle vs. automatisée)

*Cette section fait l'objet d'une publication en second auteur en cours de rédaction par Guillaume Wacquet (classification automatisée) avec la participation de Mélilotus Thyssen (échantillon Méditerranée), Véronique Créach (échantillon Mer du Nord)*

Comme vu précédemment, la cytométrie en flux permet, entre autres, de dénombrer les groupes et de caractériser rapidement les communautés phytoplanctoniques. La cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » permet d'enregistrer le profil optique des particules mesurant de 1  $\mu\text{m}$  à plusieurs millimètres de long et donc, de cibler la quasi-totalité du spectre de taille du phytoplancton (Beardall et al., 2009; Sieburth et al., 1978). L'utilisation automatisée de ce capteur à bord de navires scientifiques et/ou d'opportunité et/ou de bouées permet habituellement d'enregistrer en continu à une fréquence de mesure variant de 6 fois à 1 fois par heure (soit 144 à 24 échantillons par jour) pendant plusieurs jours voire semaines en utilisant l'assistant de programmation. Cet assistant de programmation facilite le lancement d'un

protocole en mode automatisé. Il permet de sélectionner un échantillonnage selon les jours de la semaine et la fréquence horaire (par heure et par tranche de 10 minutes). Ainsi, la meilleure résolution temporelle avec ce processus est une mesure toutes les 10 minutes. C'est la programmation utilisée pour le CytoSense du CNRS-LOG. En revanche, le CytoSense du RWS et le CytoSense du VLIZ, utilisent un protocole lancé cycliquement. Dans les deux cas, la durée d'analyse est programmée en amont. Dans le prélèvement automatisé, une fois la mesure terminée, la suivante démarrera selon la programmation effectuée en l'occurrence au minimum toutes les 10 minutes alors que dans le prélèvement cyclique, il n'y a pas de temps de pause entre deux analyses. Ces différents protocoles d'analyse sont l'explication de la différence entre les temps d'analyse du CytoSense du CNRS-LOG et des CytoSense du VLIZ et RWS. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de l'assistant de programmation et le prélèvement cyclique peuvent entraîner la génération de larges jeux de données sans intervention d'un opérateur. Dans ce sens, l'analyse des données via la méthode manuelle de gating peut se révéler fastidieuse et coûteuse en temps et ne semble pas adaptée à ces jeux de données en plus d'être « opérateur-dépendante ». L'utilisation de méthodes de classification automatisée pourrait permettre de s'affranchir de ces problèmes (Culverhouse, 2007).

Dans le cadre de JERICO-NEXT, différents partenaires ont réalisé une comparaison de leurs méthodes de gating et clusterisation automatisée. Un premier travail porte sur la comparaison d'échantillons discrets collectés dans différentes zones d'études dont le but est de montrer « l'opérateur-dépendance » lors du gating. Ainsi des échantillons de Méditerranée (MED), de Mer du Nord (NS), de Manche orientale (EEC), Mer Baltique (BAL) et Golfe de Gascogne (BOB) ont été utilisés. La procédure de classification automatisée utilisée est la classification supervisée. Un set d'apprentissage propre à chaque zone a été déterminé par l'expert de chacune des zones à partir d'échantillons indépendants des échantillons à classer dans lequel les profils optiques obtenus manuellement pour chaque groupe servent de prototypes. L'algorithme

utilisé est le « random forest » (Breiman, 2001; Fernández-Delgado et al., 2014). Dans l'ensemble de nos analyses, nous nous sommes focalisés sur les groupes fonctionnels phytoplanctoniques. Cinq groupes fonctionnels phytoplanctoniques ont pu être mis en évidence lors de cet exercice dont la correspondance avec les groupes de l'exercice d'intercomparaison décrit précédemment est donnée entre parenthèse : *Prochlorococcus*, *Synechococcus* (Pico-Synecho), picoeucaryotes (Pico-Red), nanoeucaryotes (Nano-Red + Nano-Crypto) et microphytoplancton (Micro-Red).

La figure 30 montre une forte similarité dans la caractérisation des groupes cytométriques caractérisés par les expérimentateurs (*Synechococcus*, picoeucaryotes, nanoeucaryotes et microphytoplancton) à partir des total SWS et du total FLR. Ces combinaisons d'axes ont été choisies arbitrairement mais permettent toutefois de caractériser les groupes considérés ici. Bien que la caractérisation soit similaire, il a une variabilité dans la délimitation des groupes. Cette délimitation est, par exemple, exprimée par une définition plus large des picoeucaryotes par le CNRS-LOG que par les autres participants. Pour le microphytoplancton, le CEFAS caractérise le groupe par des particules de plus petite taille (*i.e.* FWS plus faible) que les autres participants. Par conséquent, les pourcentages de zones communes pour ces groupes sont les plus faibles (picoeucaryotes : CEFAS = 56% ; CNRS-LOG = 68% et classification automatisée = 63% ; microphytoplancton : CEFAS = 32%). Les comparaisons deux à deux par matrice de Rand montrent une variation entre 2 et 68%. Cette première tâche montre ainsi que le gating est très fortement dépendant des performances intrinsèques à l'expérimentateur tel que le niveau d'expertise, la connaissance de la zone d'étude, la fatigue (Evans, 1989; Culverhouse, 2007) ainsi que la difficulté de l'expérimentateur à intégrer les informations de plusieurs profils optiques. La figure 30 permet d'observer la fiabilité et la reproductibilité de la classification automatisée par apprentissage machine par rapport à des classifications manuelles réalisées par des experts en cytométrie en flux. Les résultats montrent que la classification automatisée se

rapproche très fortement des résultats trouvés en classification manuelle. Ainsi, la classification automatisée se révèle être un élément robuste pour la classification en cytométrie en flux puisqu'elle offre des performances similaires à celle de l'analyste. Bien que la classification automatisée par apprentissage machine nécessite des prototypes fournis par l'expert, elle permet toutefois de réduire le biais entre les échantillons qui auraient pu être introduits par l'expert lors d'un gating manuel. Une précédente étude avait déjà fait état de cette observation entre l'Homme et l'apprentissage machine sur la microscopie (Culverhouse et al., 2003).

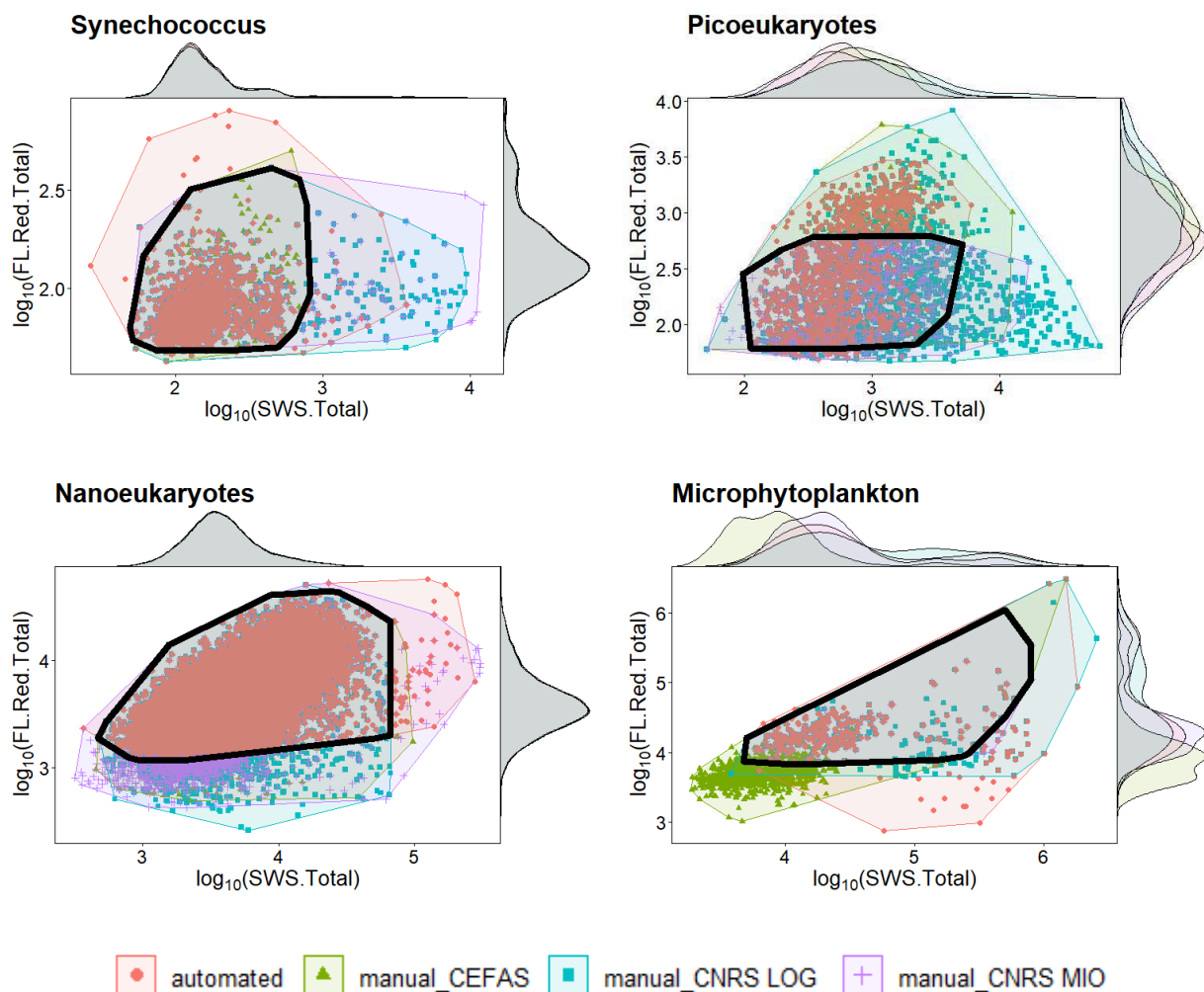


Figure 30 : Zones de chevauchement caractérisées par différentes méthodes de classification (manuelle et automatisée) pour quatre groupes phytoplanktoniques (*Synechococcus*, picoeucaryotes, nanoeucaryotes et microphytoplankton). La zone noire correspond à la zone commune aux quatre classifications.

Ceci nous amène à une seconde partie qui traite d'une intercomparaison entre des données acquises à haute fréquence lors de campagnes en Manche-Mer du Nord en 2017 (VLIZ et RWS). Après avoir pu constater que les performances entre classification automatisée et gating manuel (par le même analyste) étaient similaires, nous avons cherché à confronter le traitement manuel au traitement automatisé du package RClusTool (Wacquet et al., 2020) sur des données de campagne acquises à haute fréquence. La figure 31 montre une tendance générale similaire entre la caractérisation des groupes par la méthode de classification automatisée et le gating (clusterisation) manuel bien que des petites différences existent dans la détection des groupes.

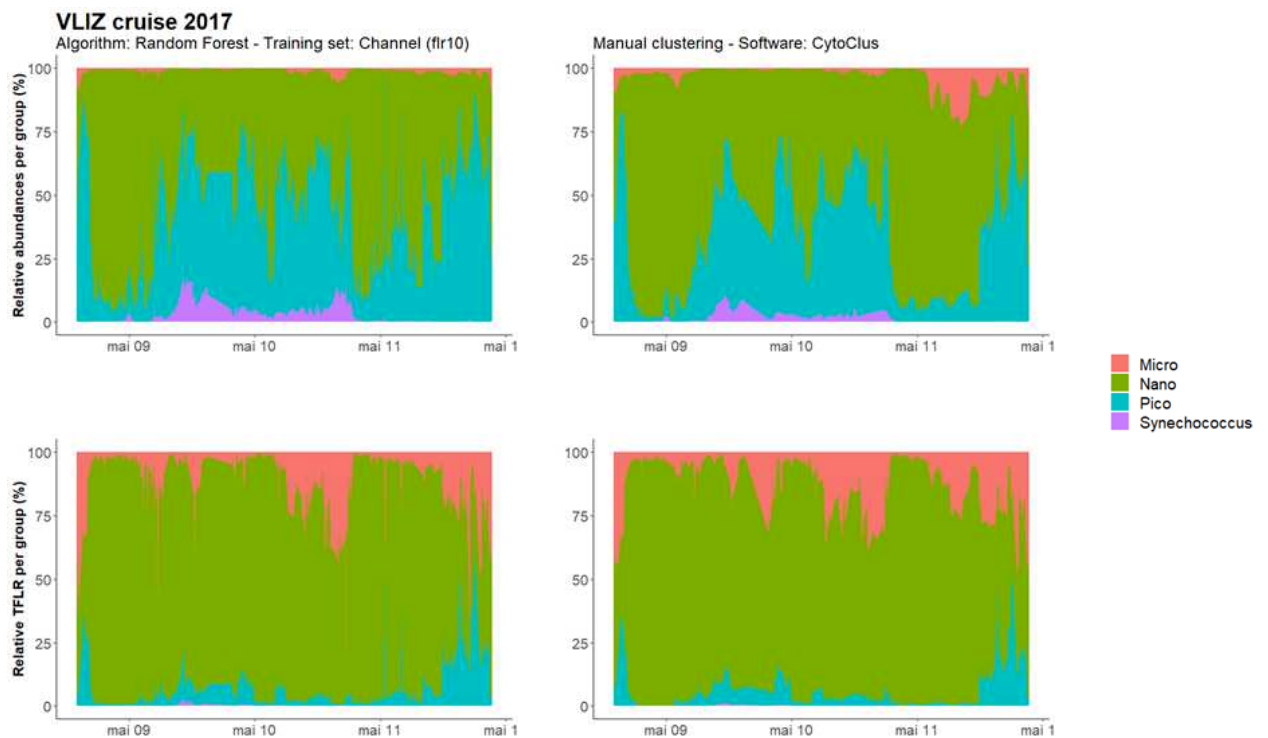


Figure 31 : Abondance relative (ligne supérieure) et contribution relative à la fluorescence totale (ligne inférieure) pour les quatre groupes phytoplanctoniques caractérisés lors de la campagne du VLIZ (08 au 12 mai 2017) par la méthode automatisée (1<sup>ère</sup> colonne) et la méthode manuelle (2<sup>ème</sup> colonne).

La principale explication provient du fait que les prototypes des clusters « pico » sont sélectionnés aléatoirement et peuvent dans ce cas correspondre à des cellules en bordure du cluster pico, à proximité du cluster nano. La même chose peut se produire pour le nano avec le pico. Ainsi la délimitation des clusters en classification automatisée est plus susceptible de confusion lors de l'attribution des cellules aux différents groupes.

Ces observations sont confirmées par le calcul des coefficients de corrélation des rangs de Spearman entre les deux méthodes (tableau 5). Les valeurs les plus hautes concernant l'abondance sont observées pour les groupes le plus facilement caractérisables : *Synechococcus*, nanoeucaryotes puis picoeucaryotes tandis que la plus faible valeur est retrouvée pour le microphytoplancton.

Tableau 5 : Coefficient de Spearman entre la méthode de classification automatisée et le gating manuel pour l'abondance et la fluorescence rouge totale par groupe et global, lors de la campagne du VLIZ (08 au 12 mai 2017).

<b>Groupes phytoplanctoniques</b>	<b>Abondance</b>	<b>TFLR</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Synechococcus	0,99	0,95	< <b>0,001</b>
Picoeucaryotes	0,84	0,59	< <b>0,001</b>
Nanoeucaryotes	0,89	0,95	< <b>0,001</b>
Microphytoplancton	0,73	0,81	< <b>0,001</b>
Global	0,88	0,95	< <b>0,001</b>

Trois explications émergent de cette faible relation et sont étroitement liées : 1) les faibles abondances vont accroître le pourcentage d'erreur d'attribution des particules ; 2) les cellules du microphytoplancton étant caractérisées par une signature optique de forme gaussienne vont accroître les zones de chevauchement et peuvent provoquer une plus grande confusion dans l'attribution des particules à un groupe ; 3) le groupe microphytoplancton comporte une grande diversité de profils optiques (Fig. 32) ce qui rend impossible l'obtention d'un prototype pour toute cette diversité de profils. Enfin, l'utilisation de l'algorithme « Random Forest » et la classification supervisée via la RclusTool permettent d'améliorer significativement le temps d'analyse des larges jeux de données. Les processus de gating manuel ainsi que le traitement par « batch » ont été chiffrés à environ 2000 minutes tandis que le traitement automatisé a accéléré d'environ 13 fois le traitement (environ 150 minutes). Ainsi, l'utilisation d'outils de classification automatisée permet de réduire considérablement le temps de l'analyste consacré à la clusterisation.

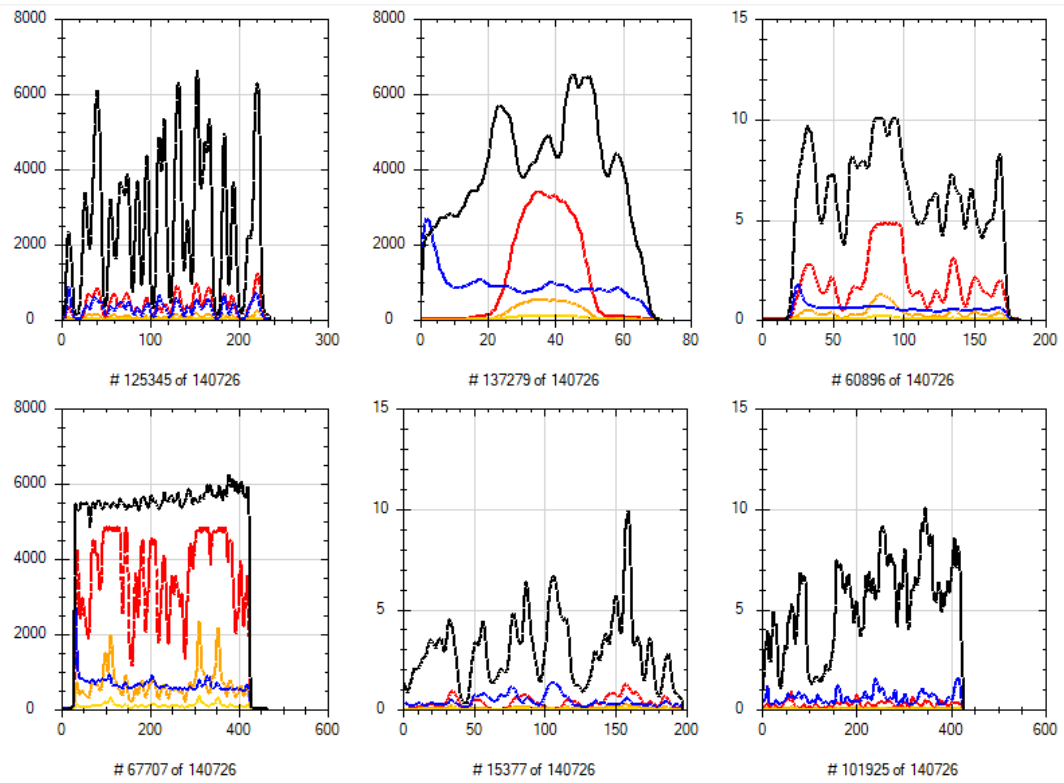


Figure 32 : Exemple de profils optiques observés dans le microphytoplancton et montrant la diversité de ces profils. Echantillon R1 du 19-05-2016 de la radiale de la Baie Saint Jean-Slack (campagnes DYPHYRAD).

## **Chapitre III : Distribution du phytoplancton, à fine résolution spatiale et temporelle, en Manche occidentale et en Manche centrale.**

Ce chapitre porte sur la distribution des communautés phytoplanctoniques et de leurs traits à fine résolution spatio-temporelle en Manche occidentale et centrale. Bien que la zone concernée soit bien étudiée (au moins sur certaines régions côtières et du large par les réseaux nationaux et régionaux d'observation et surveillance SOMLIT, COAST-HF, PHYTOBS, RLHN, REPHY, observatoire de la Manche occidentale avec les stations L4 et E1), la spatialisation des communautés phytoplanctoniques des eaux du large, et l'ensemble des écosystèmes pélagiques demeurent peu étudiés et deviennent une priorité pour la mise en place du Programme de Surveillance de la Directive Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM). L'utilisation du CytoSense lors de la campagne CAMANOC-2014 (Septembre à Octobre 2014) a permis d'intégrer une approche écosystémique de type « end-to-end » sur l'ensemble de la Manche occidentale et de la Manche centrale, incluant les zones du large ainsi que les zones sous influence continentale et ce, d'ouest en est. Cette étude met en évidence la distribution en Manche des groupes phytoplanctoniques ainsi que l'hétérogénéité de leurs traits optiques en relation avec des forçages physiques notamment les zones frontales (comme le front d'Ouessant). Cette étude quantifie aussi l'échelle à laquelle se structurent les communautés



phytoplanctoniques. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Continental Shelf Research*<sup>10</sup>.

### Résumé

Cette étude a concerné la Manche occidentale et la Manche centrale sur une période d'un mois (mi-septembre à mi-octobre), pendant la transition été-automne 2014. A cette époque de l'année, la Manche occidentale et la Manche centrale sont séparées par un front thermique et tidal bien établi, le front d'Ouessant. Ce dernier sépare les masses d'eaux stratifiées (Atlantique, mers celtiques et Manche occidentale) des masses d'eaux bien mélangées verticalement (Manche centrale et orientale). Un second front, halin cette fois-ci, est observable en Manche centrale, au niveau de l'embouchure de la Seine. Bien que de nombreuses études existent en Manche et observent ces phénomènes, celles-ci se sont concentrées jusqu'à récemment essentiellement sur des échantillonnages discrets côtiers (Hydes and Wright, 1999; Iriarte and Purdie, 2004; Jouenne et al., 2007; Marie et al., 2010; Not et al., 2004; Pannard et al., 2008a; Smyth et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010) ou sur des transects latitudinaux (Marrec et al., 2013; Napoléon et al., 2014, 2013, 2012) entre la France et l'Angleterre ou de rares transects longitudinaux à haute résolution spatiale (Garcia-Soto and Pingree, 2009). Dans l'étude présentée ici, un cytomètre en flux automatisé de type « pulse shape-recording » (CytoSense) a été utilisé pour étudier la distribution spatiale des groupes phytoplanctoniques et de leurs traits dérivés de leurs propriétés optiques en Manche. Cette étude a été réalisée via une acquisition à 11 nœuds, toutes les 10 minutes ce qui permet une résolution spatiale à sub-mésoéchelle (~3,4km). Trois objectifs ont été définis :

---

<sup>10</sup> Louchart, A., Lizon, F., Lefebvre, A., Didry, M., Schmitt, F.G., Artigas, L.F. 2020. Phytoplankton distribution from Western to Central English Channel, revealed by automated flow cytometry during summer-fall transition. *Continental Shelf Research*. 195. 104056. doi.org/10.1016/j.csr.2020.104056

- 1) Etudier la distribution à fine échelle spatiale et temporelle des groupes phytoplanctoniques définis par cytométrie en flux automatisée et leurs caractéristiques en relation avec les structures hydrologiques.
- 2) Identifier les variables environnementales et spatiales clefs qui permettent d'expliquer la variabilité dans la composition des différentes communautés.
- 3) Définir l'échelle de variabilité spatiale au sein des communautés phytoplanctoniques.

Les objectifs décrits ci-dessus ont été étudiés via trois approches analytiques : 1) la classification des masses d'eaux pour la caractérisation des communautés, 2) le partitionnement de variance pour identifier les variables expliquant la variabilité des communautés phytoplanctoniques à fine résolution spatiale et temporelle et 3) le corrélogramme de Mantel pour définir l'échelle de variabilité des communautés phytoplanctoniques.

La classification des masses d'eaux sur les communautés phytoplanctoniques a été établie à partir de l'indice de similarité de Czekanowski Jaccardisé. Cet indice génère une matrice métrique entre les échantillons permettant de conserver les distances entre les échantillons. Une matrice est générée pour les abondances et une seconde pour la biomasse et servent à générer une matrice globale. La méthode d'agrégation retenue pour l'établissement de la classification et la détermination du nombre optimal de groupes est la méthode de Ward couplée à la distance cophénétique (Legendre and Legendre, 1998; Schubert and Telcs, 2014).

L'importance de l'environnement et de la structuration spatiale dans la distribution du phytoplancton au sein des différentes communautés définies par cytométrie en flux automatisée a été étudiée par le partitionnement de variance. Quatre fractions ont été représentées : la part purement environnementale, la part purement spatiale, la part d'interaction entre l'environnement et la structuration spatiale et la part non-expliquée. La structuration spatiale a été redéfinie par le calcul de la PCNM (principal coordinates of neighbour matrix) qui est une

décomposition spectrale de l'espace. Les communautés phytoplanctoniques ont été détendancées via la transformation de Hellinger.

Le corrélogramme de Mantel permet d'étudier la relation entre les distances géographiques et les communautés phytoplanctoniques au sein de chaque masse d'eau. Cette analyse permet de détecter la distance minimale à laquelle la corrélation spatiale disparaît.

Le cytomètre en flux sert à caractériser des groupes de particules possédant des propriétés optiques similaires fournissant des informations sur la morphologie et la physiologie des groupes. Les regroupements de ces particules forment alors des groupes fonctionnels et limitent la redondance fonctionnelle. Huit groupes cytométriques ont été caractérisés à partir des signatures optiques de chaque particule : *Synechococcus*, PicoLowFLR et PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, Cryptophytes, Coccolithophore et Microphytoplancton. A partir des abondances et de la fluorescence rouge (autofluorescence de la chlorophylle *a*) par groupe, six communautés distinctes ont pu être définies. En Manche occidentale, six des huit groupes ont présenté un gradient longitudinal d'abondance avec des changements brutaux le long de la campagne. Les abondances les plus élevées ont été souvent rencontrées dans les eaux du large à proximité du front d'Ouessant. En Manche centrale, un gradient latitudinal sous l'influence de l'estuaire de la Seine a été mis en évidence. Le picophytoplancton (*Synechococcus* et picoeucaryotes) représentent alors jusqu'à 96% de l'abondance totale et la moitié de la fluorescence rouge (chlorophyllienne) des communautés près du front d'Ouessant et de la baie de Seine tandis que le nanophytoplancton (nanoeucaryotes + Coccolithophores + Cryptophytes) et le microphytoplancton représentent à leur tour 4% et moins de 1% de l'abondance totale. Ces deux derniers groupes contribuent le plus, pendant cette campagne, à la fluorescence chlorophyllienne (49,8% à 75,5% de la fluorescence chlorophyllienne totale). L'étude des traits au sein de chaque groupe fonctionnel montre une grande variabilité entre communautés. Selon les groupes fonctionnels, certains traits montrent une indépendance des

uns vis-à-vis des autres (taille et fluorescence rouge par cellule chez PicoHighFLR et les Coccolithophores, fluorescence orange (phycoérythrine) et rouge chez tous les groupes) ou à être dépendant les uns des autres (taille et fluorescence rouge chez le picophytoplancton, NanoLowFLR, NanoHighFLR, les Cryptophytes et le Microphytoplancton). Le partitionnement de variance montre que les paramètres environnementaux (température, salinité et turbidité) sont, pendant cette campagne, moins importants que les descripteurs spatiaux (processus physiques et biologiques) dans la définition des communautés. Finalement, les structures physiques en Manche ont été responsables dans la formation de patches dans la distribution des groupes fonctionnels phytoplanctoniques et ont permis de définir une structuration à sub-mésoséchelle (1-10 km) en Manche occidentale et centrale pendant la transition été-automne 2014.



**Phytoplankton distribution from Western to Central English Channel, revealed by automated flow cytometry during the summer-fall transition.**

Arnaud Louchart<sup>1\*</sup>, Fabrice Lizon<sup>1</sup>, Alain Lefebvre<sup>2</sup>, Morgane Didry<sup>1,3</sup>, François G. Schmitt<sup>1</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F 62930 Wimereux, France

<sup>2</sup> IFREMER, LER/BL, Boulogne sur mer, France

<sup>3</sup> Aix Marseille Univ., Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM110, 13288, Marseille, France

\*Contact authors: [arnaud.louchart@gmail.fr](mailto:arnaud.louchart@gmail.fr)/[felipe.artigas@univ-littoral.fr](mailto:felipe.artigas@univ-littoral.fr)

**Abstract**

Automated pulse shape-recording flow cytometry was applied to address phytoplankton spatial distribution, at high frequency, in stratified and well mixed water masses in the Western and Central English Channel during the summer-fall transition. Cytometric pulse shapes derived from optical features of single cells allowed the characterization of eight phytoplankton groups. Abundance and total red fluorescence (chlorophyll *a* autofluorescence) per group were used to define six phytoplankton communities. Their distribution revealed high spatial heterogeneity. Abundance presented a longitudinal gradient for six over the eight groups and succession of brutal shifts along the cruise. Maximum values were often located near the Ushant front in the Western English Channel. A latitudinal gradient characterized the Central English Channel waters under the influence of the Seine estuary. Picophytoplankton (*Synechococcus*-like cells and picoeukaryotes) represented up to 96% of total abundance and half of the total red fluorescence of the communities near the main front and the Bay of Seine, whereas nanoeukaryotes and microphytoplankton, represented only 4% and less than 1% respectively of total abundance. Both nanoeukaryotes and microphytoplankton dominated the total red fluorescence of the communities of the Central English Channel. The study of traits within each group showed a high variability of traits between communities. The comparison between traits showed that they were independent from each other for some groups (size and red fluorescence per cell for PicoHighFLR and Coccolithophore-like cells; orange and red fluorescence for all the groups), whereas they were dependent for other groups (red fluorescence per cell was dependent of size for picophytoplankton, NanoLowFLR, NanoHighFLR, Cryptophyte-like cells and Microphytoplankton). Variance partitioning revealed that the environmental parameters (temperature, salinity and turbidity) accounted less than spatial descriptors (physical and biological processes) in shaping the communities. Hydrological structures (frontal structures, eddies and tidal streams) were responsible for patches of phytoplankton and defined the structure at the sub-mesoscale (1 – 10 km) in this area.

**Keywords:** English Channel; phytoplankton distribution; high resolution; automated flow cytometry; fronts; mesoscale structure



## 1. Introduction

Carbon uptake and fixation through photosynthesis (Falkowski, 1994; Falkowski et al., 1998; Gregg et al., 2003) make phytoplankton account for up to 50% of the annual global net primary production, while its biomass only represents 2% of the total global biomass (Falkowski et al., 2003; Field et al., 1998). Furthermore, phytoplankton are involved in many biogeochemical cycles (Falkowski, 1994; Falkowski et al., 1998; Gregg et al., 2003) and in most of the marine food webs being a prey for grazers affecting growth, cellular processes and community composition (Holligan and Harbour, 1977; Winfried Lampert et al., 1986; Rassoulzadegan et al., 1988). Given the importance of phytoplankton in marine ecosystems, there is a consequent need to perform accurate estimates of abundance and biomass (which are also defined as biological descriptors in the Marine Strategy Framework Directive (MSFD 2008/56/EC) and Water Framework Directive (2000/60/EC) in order to understand the populations assembly into different communities and how these communities influence/determine biogeochemical cycles as well as higher trophic levels (*e.g.* Falkowski et al., 1998; Litchman, 2007; Litchman et al., 2007). The large size-range and diversity of phytoplankton characterise high variations of surface/volume ratios as well as physiological capacities, leading to a different capacity of growth among phytoplankton, sometimes dividing twice a day (Alpine and Cloern, 1988). In addition, environmental drivers are often episodic, contributing to quick changes of phytoplankton responses over space and time scales. Current monitoring sampling strategies might fail to detect these responses (Pearl et al., 2007). Therefore, a trade-off in phytoplankton sampling strategies is needed in order to understand the determinism of phytoplankton changes and distribution, considering both fine space and time scales and environmental parameters.

Considering the techniques available, the use of microscopy and HPLC pigment analysis provide, respectively, high taxonomical and pigmentary composition. However, they are not suitable for high space and time resolution studies (Cullen et al., 1997; Millie et al., 1997;

Richardson and Pinckney, 2004) because of the time-consuming and highly specialised work to be carried out back at the laboratory. On the other hand, despite *in vivo* fluorometry could reach a reliable space and time coverage (Rantajärvi et al., 1998), it provides only bulk measurements as estimates of total chlorophyll *a* (as a proxy of phytoplankton biomass). Several innovative techniques (*e.g.* multispectral fluorometry, automated flow cytometry, remote sensing) have shown to give representative insights into phytoplankton composition (at least at the functional level), abundance and/or chlorophyll *a* at high resolution (Bonato et al., 2015; De Monte et al., 2013; Lefebvre and Poisson-Caillault, 2019; Marrec et al., 2018, 2014; Thyssen et al., 2015). Among these techniques, automated “pulse shape-recording” flow cytometry (PSFCM) addresses almost the whole phytoplankton size-range (c.a. from less than 1µm to 800 µm width) at single-cell or single-colony level and characterizes them based on their combined or integrated optical properties (*i.e.* light scattering, fluorescence; Dubelaar et al., 2004, 1999). Indeed, this technique records the entire pulse shape of a single particle (Rutten et al., 2005; Thyssen et al., 2008b, 2008a), from small cells as *Prochlorococcus*-like (Marrec et al., 2018) up to large cells and/or colonies of diatoms or *Phaeocystis globosa* (Bonato et al., 2016, 2015; Rutten et al., 2005). Moreover, the cytometric optical properties provide useful proxies of cell length, width, morphology, internal composition and physiology which can be assimilated to functional derived traits. Therefore, the variation of phytoplankton traits at high frequency remain to be investigated across the different spatial scales.

The Western and Central part of the English Channel are well-documented areas which benefit from sustained monitoring (*e.g.* Astan Buoy, Astan & Estacade SOMLIT stations, L4 and E1 stations; Eloire et al., 2010; Goberville et al., 2010; Not et al., 2004; Smyth et al., 2010; Sournia et al., 1987). This epicontinental sea is strongly impacted by climate variability (Goberville et al., 2010) making seasonal and interannual variation in the hydrological and climatic conditions responsible of changes in plankton communities composition (Foulon et al., 2008; Marie et al.,

2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010). In the Western English Channel (WEC), from May to October, the hydrological conditions go from well-stratified to well-mixed conditions and shape the position of the Ushant tidal front (Pingree and Griffiths, 1978). Eddies that bring high nutrient concentrations in addition to the light, make communities accumulating along the front, especially diatoms and dinoflagellates, and contribute to high biomass (Landeira et al., 2014; Pingree et al., 1979, 1978, 1977). Moreover, the geostrophic flow, eddies, wind upwelling and tidal streams occur along the front allowing phytoplankton dispersion and crossing the front (Pingree et al., 1979). Therefore, the front extends on scales from meters to kilometres (d'Ovidio et al., 2010; Ribalet et al., 2010). In the Central English Channel (CEC), both the English and the French coast are influenced by river run-off. In the French part, the Seine River contributes to form permanent halocline stratification (Brylinski and Lagadeuc, 1990; Menesguen and Hoch, 1997). During the late summer-fall period, the Bay of Seine is initially characterised by high abundance of diatom (Jouenne et al., 2007). Then, when the depletion of nutrient occurs in summer, diatom abundance decrease and dinoflagellate abundance increase (Thorel et al., 2017). Along the English coast, the Southampton Water estuarine system contributes largely to enhance nutrients along the coast (Hydes and Wright, 1999). Nutrients are especially brought by the Test and Itchen rivers, which drain agricultural land as well as sewage discharge effluents (Hydes and Wright, 1999) resulting in chlorophyll *a* peaks in spring and summer (Iriarte and Purdie, 2004; Kifle and Purdie, 1993; Leakey et al., 1992).

Despite most of phytoplankton studies in the English Channel concerned the coastal areas (*e.g.* Hydes and Wright, 1999; Iriarte and Purdie, 2004; Jouenne et al., 2007; Marie et al., 2010; Not et al., 2004; Pannard et al., 2008; Smyth et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010), some of them concerned coastal-offshore gradients focusing both in the Eastern English Channel (EEC, Bonato et al., 2016, 2015; Lefebvre and Poisson-Caillault, 2019),

Central English Channel (WEC, Napoléon et al., 2014, 2012) and Western English Channel (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013; Napoléon et al., 2013) (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013; Napoléon et al., 2014, 2013, 2012). Some attempts were carried out on transects crossing the English Channel in the WEC and CEC (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013; Napoléon et al., 2013). However, these studies reflected three major drawbacks: first of all, some transects were carried out along a latitude gradient, missing the longitude component in which spatial gradients are particularly known to occur in the English Channel (Napoléon et al., 2014, 2013, 2012). Secondly, most of them resulted in a spatial aliasing by missing any fine spatial scale variability. Finally, these spatiotemporal studies mainly sampled the largest organisms ( $> 20 \mu\text{m}$ ) of the phytoplankton compartment, missing most of the picophytoplankton and the small nanophytoplankton ( $< 20\mu\text{m}$ ) fraction.

In the present study, we analyse the spatial distribution of some phytoplankton size- and optically-defined functional groups as well as their assembly in communities, highlighting the relation between environmental and spatial features with phytoplankton communities' variability, addressed at high frequency, on a high spatial sampled gridded area. Phytoplankton single-cells and colonies were characterised by continuous recording of sub-surface pumped seawater, by using an automated "pulse shape-recording" flow cytometer coupled to continuous recording hydrological features. With a high resolution spatial sampling strategy, our aims were: (i) to study the phytoplankton distribution per functional group and the variation of the traits within each group across space with respect to meso- to sub-mesoscale hydrological features as frontal areas (ii) to identify the key environmental and spatial variables that could explain the variability between communities' composition and (iii) to define the scale of variability of phytoplankton communities among sites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cruise outlines

Samples were collected during a multidisciplinary cruise focusing on an ecosystemic end-to-end approach of fisheries in the Western English Channel. The CAMANOC (CAMPagne MANche OCCidentale, Travers-Trolet and Verin, 2014) cruise took place on board the RV *Thalassa* (Ifremer) from the 16<sup>th</sup> of September to the 16<sup>th</sup> of October 2014, during the summer-fall transition. The ship crossed the English Channel from West to East (Fig. 33). A Pocket-FerryBox system (PFB, 4H-JENA) was coupled to a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM, CytoSense, Cytobuoy), a thermosalinometer (SeaBird SBE21) and an *in vivo* fluorometer (Turner Designs 10-AU). *In vivo* fluorometer required a two steps calibration. The first one used a blank water (de-ionized water) and the second one used a solid standard. The water intake was at the front of the ship's cooling system at a fixed depth (4 m), and in normal ship operation seawater is constantly pumped. The PFB was assembled with sensors for salinity and temperature (Seabird 45 micro TSG), and turbidity (Seapoint). Seawater was pumped at 4 m depth and was continuously analysed by all the sensors. The acquisition of data was continuously performed, and we obtained an integration of the measurement from 1 minute (PFB) to 10 minutes (PSFCM). Because of a relatively brief transit time of water from the water intake to PFB, the observations are representative of sub-surface conditions. The lower resolution was kept to merge phytoplankton functional features with environmental data. The ship navigated at the speed of 11 knots for 1 month. This led to a resolution of approximately 3.4 km (for automated flow cytometry) with a total of 2910 samples, considering stops for discrete fisheries, benthos, plankton and hydrological sampling.

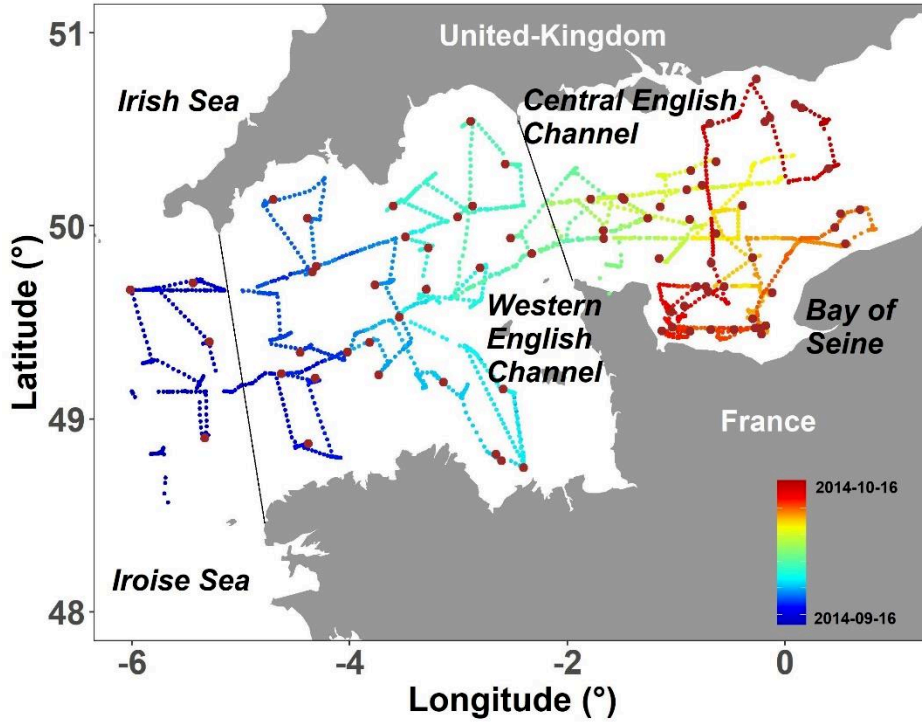


Figure 33 : Continuous recording every 10 minutes by a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM) during the CAMANOC cruise from Sept. 16th (blue dots) to Oct. 16th (red dots) and 78 discrete (CTD) stations (brown dots). Dashed lines correspond to geographical separation of the main regions: Celtic Seas (including Irish and Iroise Sea), Western English Channel and Central English Channel.

## 2.2. Stratification and mixing of water masses

CTD (Seabird SBE 21) casts (78) were performed during the cruise. Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinity, density ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and depth (m) were recorded at a rate of 1 measure per second. We used the density from the CTD casts to calculate the squared of buoyancy frequency,  $N^2$  ( $\text{s}^{-2}$ ; 7), in order to quantify the vertical density gradient throughout the water column which quantifies the stratification:

$$N^2 \equiv g/\rho_0 \times (\delta\rho(z) / \delta z) \quad (7)$$

where  $g$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ) is the acceleration due to gravity,  $\rho_0$  ( $1026 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) is seawater reference density,  $\delta\rho$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) is the density differential along the water column and  $\delta z$  is the depth of the water column, between surface and bottom.

### 2.3. Plankton analysis

Continuous pumped waters as well as discrete samples were analysed by a CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherlands), an automated flow cytometer (FCM) with the ability of recording the entire optical pulse shape of each particle (“pulse shape-recording flow cytometer”: PSFCM). Five signals compose a particle optical profile. The forward scatter (FWS) is collected via a PIN photodiode whereas the sideward scatter (SWS) and three types of fluorescence: red fluorescence (FLR: 668-734 nm), orange fluorescence (FLO: 604-668 nm) and yellow fluorescence (FLY: 536-601 nm) are collected via a photomultiplier. The instrument uses a solid-state laser (Coherent Inc, 488 nm, 50 mV) to analyse, count and characterise single-cells and colonies (Dubelaar et al., 2004; Pomati et al., 2013; Pomati and Nizzetto, 2013) from 1  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$  width and a few mm length (Dubelaar et al., 1999). Each particle passes through a 5  $\mu\text{m}$  laser beam at a speed of 2  $\text{m s}^{-1}$ . A trigger-level was used on the red fluorescence (FLR) in order to separate phytoplankton and non-fluorescent particles (Thyssen et al., 2015). Continuous recording was performed with this configuration and the trigger-level was set at 15 mV during 9 min at a flow rate of 4.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ . The clustering was performed manually with the CytoClus software (Cytobuoy b.v., [www.cytobuoy.com](http://www.cytobuoy.com)). The determination of each group was processed considering the amplitude and the shape of the five signals, referring also to previous work on automated flow cytometry in this area (Bonato et al., 2016, 2015; Thyssen et al., 2015) and according to bead size calibration. In addition, the CytoClus software provides several statistical features on each signal (*e.g.* Length, Total, Average...) as well as the distribution of the different populations of events. The length of the FWS was used as a proxy for cell size. A standardisation of each particle from each cluster was carried out with calibrated beads of 3  $\mu\text{m}$ . Two thresholds were set up: the first around 3  $\mu\text{m}$  in order to separate picoeukaryotes from nanoeukaryotes and the second around 20  $\mu\text{m}$  in order to separate nanoeukaryotes from microphytoplankton. A group was named according to its estimated size and to its pigmentary

features. Following Bonato et al. (2015) particle size was corrected with the measured length FWS of the beads (8 & 9).

$$\text{Correction factor} = \text{real beads size} / \text{Measured beads size} \quad (8)$$

$$\text{Estimated particles size } (\mu\text{m}) = \text{Measure particles size} \times \text{Correction factor} \quad (9)$$

Based on the common vocabulary for automated FCM (available at <https://www.seadatanet.org>), we characterised 6 main functional groups by automated flow cytometry: *Synechococcus*-like cells, picoeukaryotes, nanoeukaryotes, Cryptophyte-like cells, Coccolithophore-like cells and Microphytoplankton. In addition, sub-groups were characterised within the picoeukaryotes and nanoeukaryotes groups, according to their red fluorescence's level. Finally, we defined three picophytoplankton groups (<3 $\mu\text{m}$ ): *Synechococcus*-like cells, PicoLowFLR, PicoHighFLR; four nanoeukaryotes groups (3 to 20 $\mu\text{m}$ ): Cryptophyte-like cells, Coccolithophore-like cells, NanoLowFLR and NanoHighFLR; and one microphytoplankton group (>20 $\mu\text{m}$ ; Fig. 34).



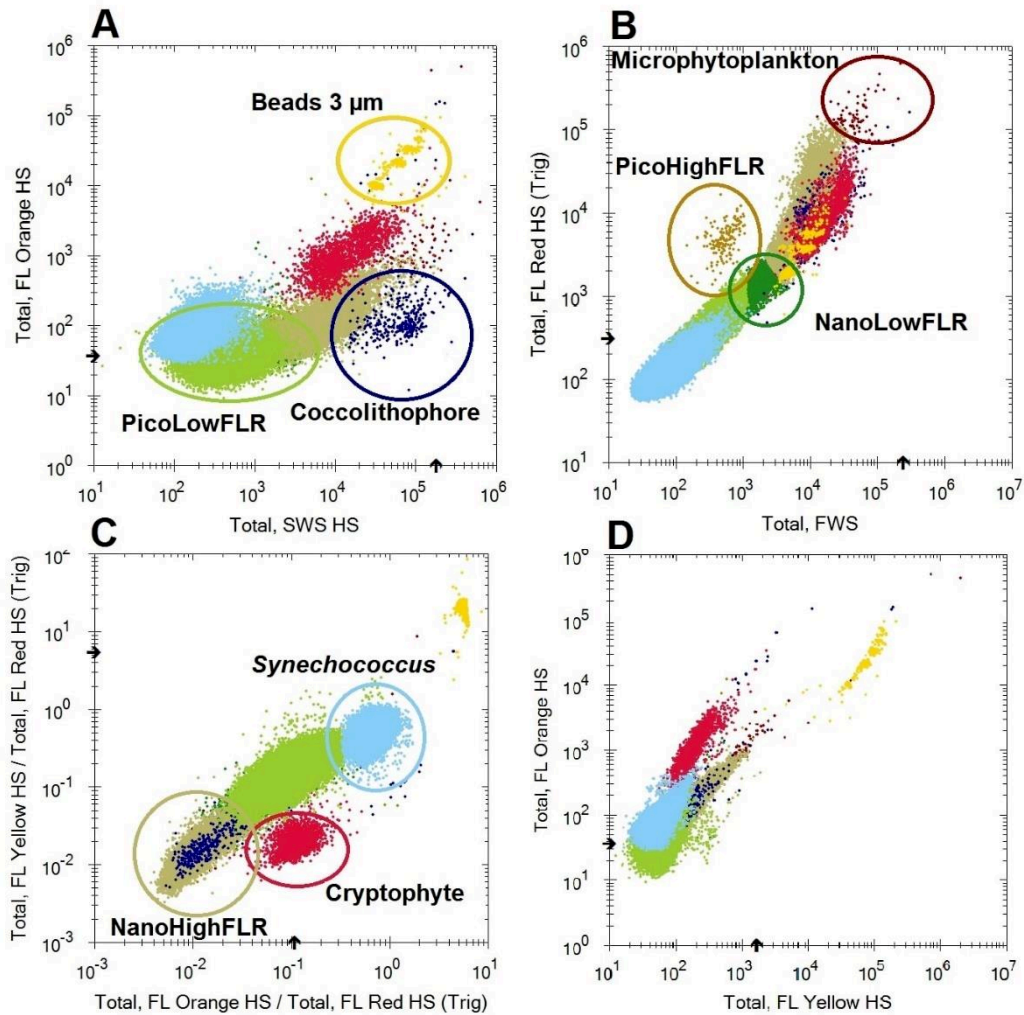


Figure 34 : Cytograms allowing the characterisation of different phytoplankton groups. (A) Total Orange Fluorescence (TFLO) vs. Total Sideward Scatter (Total SWS). (B) Total Red Fluorescence (TFLR) vs. Total Forward Scatter (Total FWS). (C) Ratio of Total Yellow Fluorescence over Total Red Fluorescence and Total Orange Fluorescence over Total Red Fluorescence (TFLY/TFLR)/(TFLO/TFLR). (D) Total Orange Fluorescence (TFLO) vs. Total Yellow Fluorescence (TFLY). Clusters of single, doubles and triples of beads of 3 μm are merged here.

## 2.4. Statistical analysis and mapping

We considered the environmental parameters (*i.e.* temperature, salinity and turbidity) and *in vivo* total fluorescence obtained either by the thermo-salinometer (temperature and salinity), the PFB (turbidity) and the Turner fluorometer (*in vivo* total fluorescence) to compute a hierarchical classification analysis based on Euclidean distance. A hierarchical classification was computed

also for cytometric groups, separately, to characterize the similarity between the phytoplankton communities among the sites. We used scaled data to detect the similarity among the relative changes in community composition, and we computed the Jaccardized Czekanowski similarity index (also known as quantitative Jaccard). In most recent studies on the spatial distribution of phytoplankton, the common procedure is a computation of Bray-Curtis dissimilarity matrix to define communities (P Legendre and Legendre, 1998). However, Bray-Curtis generates a semi-metric matrix which is not as strong as the quantitative Jaccard which generates a metric matrix for cluster analysis. Thus, the Jaccardized Czekanowski index would be more suitable than Bray-Curtis for similarity studies (Schubert and Telcs, 2014). This distance was computed per phytoplankton feature (*i.e.* abundance, red fluorescence) calculated from the cytometric groups such as described in Bonato et al., (2015) in order to get the similarity between pairs of samples. We processed the computation of an average similarity matrix between a matrix based on abundance and a matrix based on red fluorescence. This method is more reliable than using them separately because abundance and red fluorescence (proxy of chlorophyll content which in turn is used as a proxy of biomass) are considered as the main features to discriminate the communities. Each function was weighted between 0 and 1. Abundance accounted for 0.5 as well as red fluorescence. We coupled the final similarity matrix with the Ward method (Ward, 1963) which consist in aggregating at each step the two clusters with the minimum within-cluster inertia and detect the homogeneity of the clusters. Then, the optimal classification cut level was obtained by selecting the maximum average silhouette over the Cophenetic distances. These analyses were processed on R environment, using the packages “vegan”, “analogue” and “cluster” available on the CRAN repository ([www.cran.r-project.com](http://www.cran.r-project.com)). The importance of environment and space (defined as the Euclidean distance between a pair of latitude and longitude coordinates) for structuring phytoplankton communities was studied among each community by processing a variation partitioning (Borcard et al. 1992, Peres-Neto et al. 2006).

In our model, the total variance is represented by four fractions [a + b + c + d] where [a + b] represents the environmental fraction; [b + c] represents the space fraction; [b] is the interaction between environment and space and [d] the residual variance. Space was redefined by the calculation of the principal coordinates of neighbour matrices (PCNM, Borcard and Legendre, 2002) to define them as spatial descriptors of the relationship among sampling units. We used the *pcnm* function from the “vegan” package design for R environment. Phytoplankton communities were detrended using the Hellinger transformation which is appropriate for compositional data by reducing the impact of rare events which are more susceptible to sampling error (Legendre and Gallagher, 2001). In addition, transformation of the data will give the same weight to rare or very abundant groups. Partitions were tested by ANOVA over 999 permutations. Finally, we carried out a multivariate Mantel correlogram to investigate the relationship between geographical distance extracted from the latitude-longitude coordinates and phytoplankton communities over the water bodies. This analysis allowed the detection of the minimal distance at which the correlations disappear.

### **3. Results**

#### **3.1. Hydrobiology**

Each continuous-recorded physical variable as well as *in vivo* total fluorescence ( $\mu\text{g}$  equivalent of chlorophyll *a* per L) showed a strong spatial structure. The highest salinity values were recorded in the Western English Channel (35.5; WEC) and decreased moderately towards the East (35). In the Central English Channel (CEC) salinity strongly decreased from 35 in offshore waters to 33 in the inner part of the Bay of seine (BOS; Fig. 35A). Colder waters characterised the entrance of the WEC and were surrounded by warmer waters both in the Celtic Seas as well as in mid WEC waters (Fig. 35B). Sharp transitions were evidenced (of only a few kilometres) both at the West and East of the colder area.

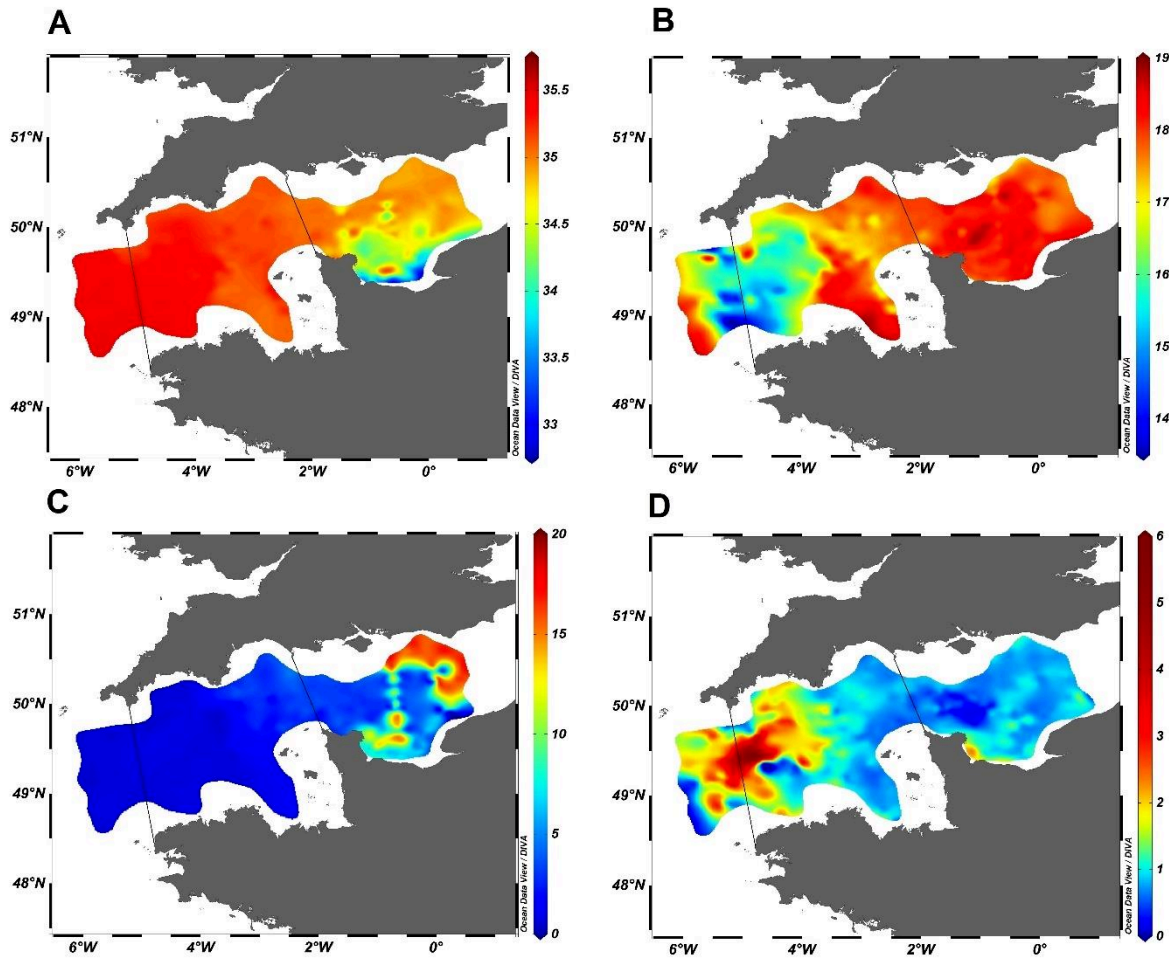


Figure 35 : Continuous recording of: A. Salinity, B. Temperature (°C) C. Turbidity (NTU) D. Chlorophyll *in vivo* Fluorescence ( $\mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ).

The highest turbidity values were recorded in the CEC, both in offshore and coastal waters (Fig. 35C). A sharp increase in chlorophyll *in vivo* fluorescence was evidenced from the outer shelf to the WEC (values shifted from around  $0.1 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$  to  $5.7 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ). Then, fluorescence levels decreased rapidly eastward in WEC (from  $5.7 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$  to  $1\text{-}1.5 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ; Fig. 35D). Spearman ranks correlation were negative and significant with temperature ( $\rho = -0.45$ ,  $p < 0.001$ ) and turbidity ( $\rho = -0.29$ ,  $p < 0.001$ ) whereas Spearman rank correlation between fluorescence and salinity was positive and significant ( $\rho = 0.31$ ,  $p < 0.001$ ).

Applying hierarchical clustering on the similarity matrix revealed 5 water masses (WM) in the English Channel (Fig. 36A). Mapping these water masses revealed that Western and Central

English Channel were structured in hydrological blocks. WM1 corresponded to the eastern part of the Western English Channel and Celtic Seas out of the Channel (Iroise and Irish Seas), whereas WM3 was located in between, in the centre of the WEC. WM2 was located in offshore waters mainly in the CEC. WM4 was under the influence of the Bay of Seine and WM5 was considered as mainly corresponding to the English coastal and offshore waters of the CEC.

Tableau 6 : Minimum and maximum values of temperature, salinity, turbidity and in vivo chlorophyll fluorescence (Chl Fluo) among the 5 water masses.

Water mass		Temperature (°C)	Salinity	Turbidity (NTU)	Chl Fluo ( $\mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ )
WM1	Min;	[16.97; 18.84]	[34.04; 35.49]	[0.01; 3.35]	[0.31; 1.67]
	max				
	CV (%)	2.5	0.4	50	25
WM2	Min;	[17.55; 18.95]	[33.17; 35.16]	[2.62; 4.87]	[0.11; 1.47]
	max				
	CV (%)	1.5	1.0	15	39
WM3	Min;	[13.94; 18.12]	[35.16; 35.53]	[0.51; 1.31]	[0.49; 5.71]
	max				
	CV (%)	5.5	0.2	19	48
WM4	Min;	[17.61; 18.31]	[33.11; 34.82]	[6.23; 14.28]	[0.57; 2.31]
	max				
	CV (%)	0.7	1.1	27	33
WM5	Min;	[16.91; 17.93]	[33.78; 35.00]	[6.34; 18.73]	[0.59; 1.16]
	max				
	CV (%)	1.2	0.2	4.5	12

The lowest temperature was recorded in the WM3 revealing also the strongest gradient ( $\Delta T = 4.18^\circ\text{C}$ , Fig.36B and table 6) whereas this water mass exhibited high stable salinity thus the lowest salinity gradient ( $\Delta\text{SAL} = 0.37$ , Fig.36A and table 6) among the water masses. The opposite pattern was observed in the WM1, WM2, WM4 and WM5, the difference of temperature was comprised between  $0.70^\circ\text{C}$  (WM4) and  $1.87^\circ\text{C}$  (WM1) with higher values than in WM3 whereas the salinity difference was comprised between 1.22 (WM5) and 1.99 (WM2) with lower values than in the WM3. Turbidity was also lower in WM3 than in any other WM and showed a small difference ( $\Delta\text{TURB} = 0.8$  NTU). The highest range of turbidity values were found in the WM4 and WM5 (respectively  $\Delta\text{TURB} = 8.05$  NTU and  $\Delta\text{TURB} = 12.39$  NTU), both WM under the influence of the Solent (UK) and Seine (France) estuaries. In WM3,

*in vivo* chlorophyll fluorescence (Chl Fluo) was higher than in any other water mass and showed the highest variability ( $\Delta\text{Chl Fluo} = 5.22 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ).

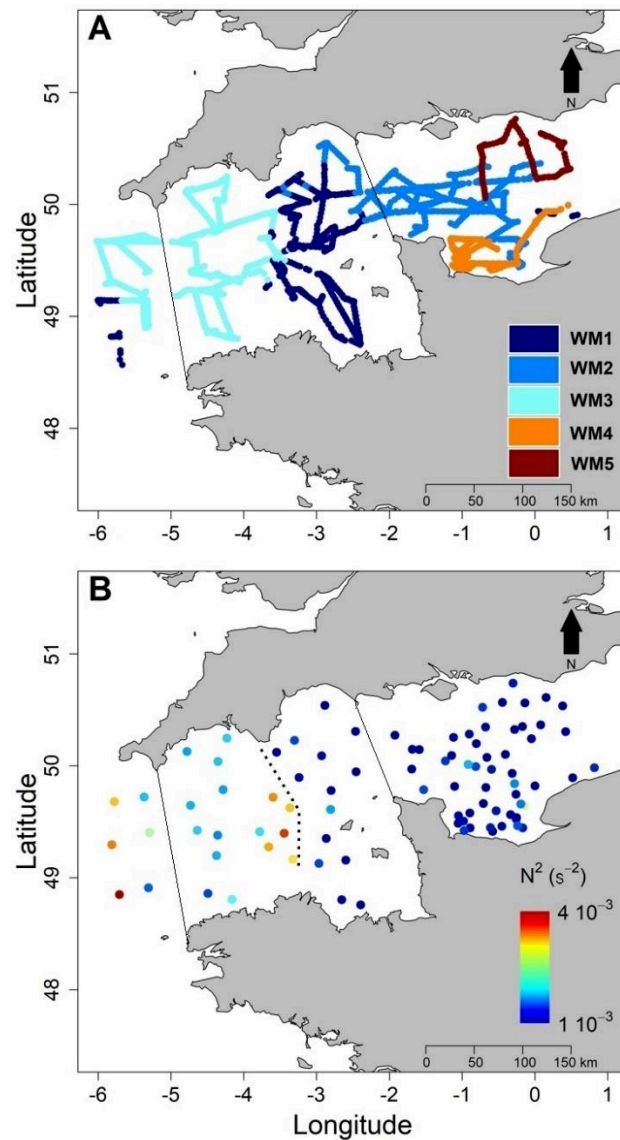


Figure 36 : A. Identification of water masses based on results from the Euclidean distance matrix on temperature, salinity, turbidity and *in vivo* chlorophyll fluorescence. B. Stratification, value of  $N^2$ , as derived from CTD casts. The dashed line distinguishes homogeneous water masses from heterogeneous water masses and marks the front.

On the West of the main frontal structure (WEC, Fig. 36B), corresponding to WM3,  $N^2$  values were higher and displayed more heterogeneous waters than in the East side (CEC and BOS), where the values of  $N^2$  were lower and displayed homogeneous waters. In the WEC (WM3),

$N^2$  values reached up to  $10^{-3} \text{ s}^{-2}$  whereas in the CEC and the BOS (WM2, WM4 and WM5), the order of magnitude of  $N^2$  values was between  $10^{-4}$  and  $10^{-5} \text{ s}^{-2}$  (Fig. 36B). In the Celtic seas, the  $N^2$  was recorded between  $3.5$  and  $4.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  decreasing sharply eastward with the shift of temperature to reach  $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  in the WEC. They define the outer thermal front as well as the western limit between WM1 and WM3. Then a second change occurred between the WEC and the CEC. The values of the  $N^2$  in WM3 of up to  $4.0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  shifted to  $10^{-4} / 10^{-5} \text{ s}^{-2}$  the CEC (WM2, WM4) and the BOS (WM5) defining the inner thermal front.

### 3.2. Phytoplankton abundance, fluorescence and spatial distribution.

Picoeukaryotes (PicoLowFLR and PicoHighFLR) and *Synechococcus*-like cells dominated the phytoplankton abundance. They were structured along a decreasing West-East longitudinal gradient but showing an important heterogeneity in spatial distribution (Fig. 37). High abundance was recorded in the Western English Channel (mostly in WM3) whereas low values were recorded in the Central English Channel and, for Picoeukaryotes, at the western entrance of the English Channel (Celtic Seas, Fig. 37 and 38). However, the abundance of *Synechococcus*-like cells was high out of the Channel and in the WEC, and low in the CEC (Fig. 37A). PicoLowFLR abundance exhibited patches reaching more than  $1 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  in the WEC (5% of the highest abundance were representing  $950 \text{ km}^2$ ) and close to the Channel isles (Fig. 37B). PicoHighFLR (Fig. 37C) and Cryptophyte-like cells (Fig. 37D) showed the same patterns: low abundance out of the English Channel, sharp increase and high abundance in the WEC (both coastal and offshore waters, WM3), then a sharp decrease and low abundance in the eastern WEC and CEC. Coccolithophore-like cells (Fig. 37E) exhibited high abundance out of the Channel (western WM1), while the abundance remained low elsewhere. NanoLowFLR (Fig. 37F) showed several patches of high abundance (5% of the highest abundance represented  $1000 \text{ km}^2$ ) between the limits of WM3 (out of the Channel and in the WEC). In the CEC and BOS, the abundance was low. NanoHighFLR high abundance was also

detected in WM3, forming a large patch in offshore waters of the WEC (Fig. 37G), decreasing westward and eastward, showing an increase in a restricted area in the Bay of Seine. Microphytoplankton abundance (Fig. 37H) was low out of the English Channel. Then, patches of high abundance were observed in western WM3, in offshore waters of the WEC. In the CEC and BOS, the abundance was low.

The abundance of each group was compared with respect to the distance of the inner WEC thermal tidal front used as an arbitrary geographical reference (Ushant front, Fig. 38). Samples located to the West of the front were represented by a negative distance whereas samples located to the East of the front were represented by a positive distance. A global view revealed that abundance increased as the sample got collected closer to the Ushant frontal area (Fig. 38). This was the case for PicoHighFLR (Fig. 38.C), Cryptophyte-like cells (Fig. 38.E), and NanoLowFLR (Fig. 38.F). On the other hand, NanoHighFLR (Fig. 38.G.) and Microphytoplankton groups (Fig. 38.H.) showed maximum abundance slightly offset (westward) of the front (microphytoplankton also showing high values all along the front). For these groups (PicoHighFLR, Cryptophyte-like cells, NanoLowFLR, NanoHighFLR and Microphytoplankton), the highest levels of abundance were recorded in WM3 which is the most stable water mass observed here. PicoLowFLR (Fig. 38.B), *Synechococcus*-like cells and Coccolithophore-like cells showed a different pattern. The first two groups exhibited high abundance along and across the front in the Western English Channel and in the Celtic Seas (Fig. 38.A) whereas Coccolithophore-like cells showed highest abundance only in shelf waters at the western entrance of English Channel (Fig. 38.D) where waters remained warm and stable (outer front of the WEC). At the East of the inner front, the abundance decreased slowly to reach low values at 100 km from the main frontal system (Fig. 38). At 200 km from the front, a second increase of abundance was observed (Fig. 38) for some groups. A *Synechococcus*-like cells (Fig. 38.A.), PicoLowFLR (Fig. 38.B), PicoHighFLR (Fig. 38.C), NanoHighFLR (Fig.



38.G) and, to a lesser extent, Microphytophytoplankton (Fig. 38.H) and Coccolithophore-like cells (Fig. 38.D) showed high values compared to the remaining CEC. However, this second peak was 2 to 3 times lower than the one observed close to the main front and could be related to the Seine river plume.

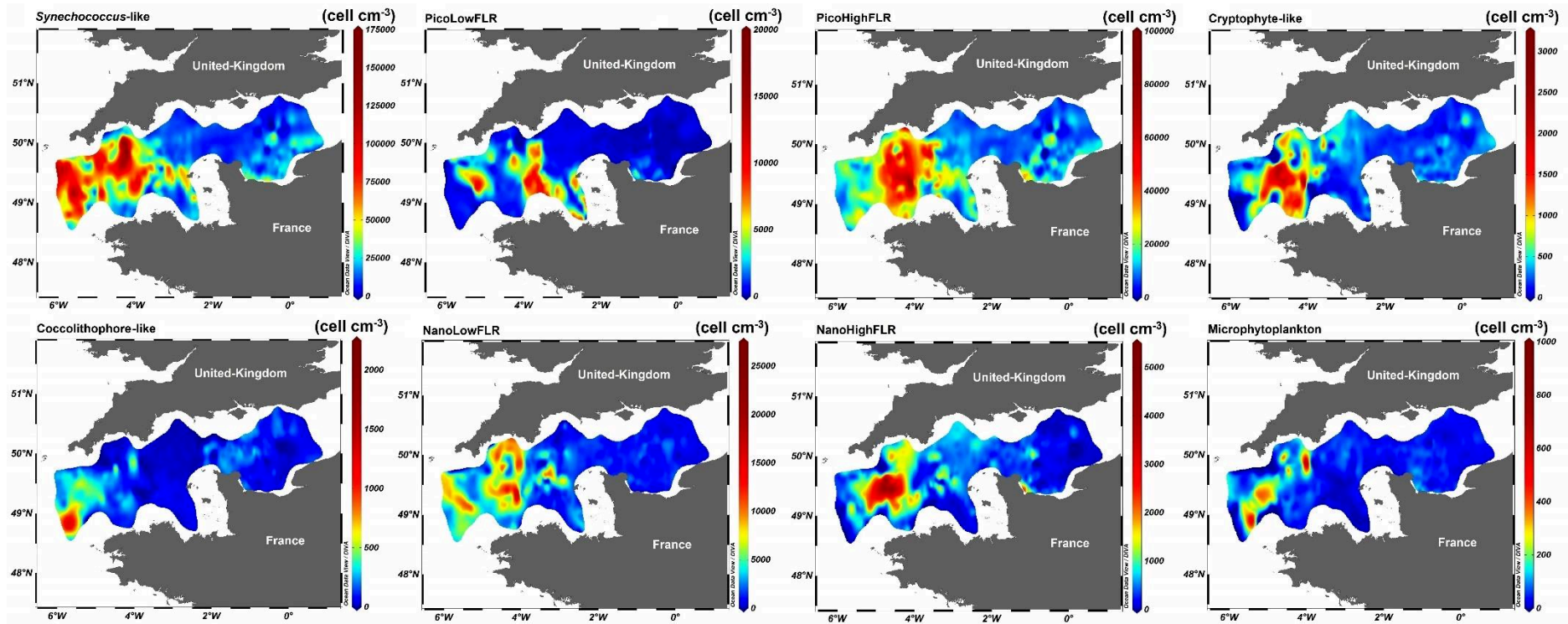


Figure 37 : Spatio-temporal distribution of the abundance of the eight phytoplankton groups characterised by the PSFCM.

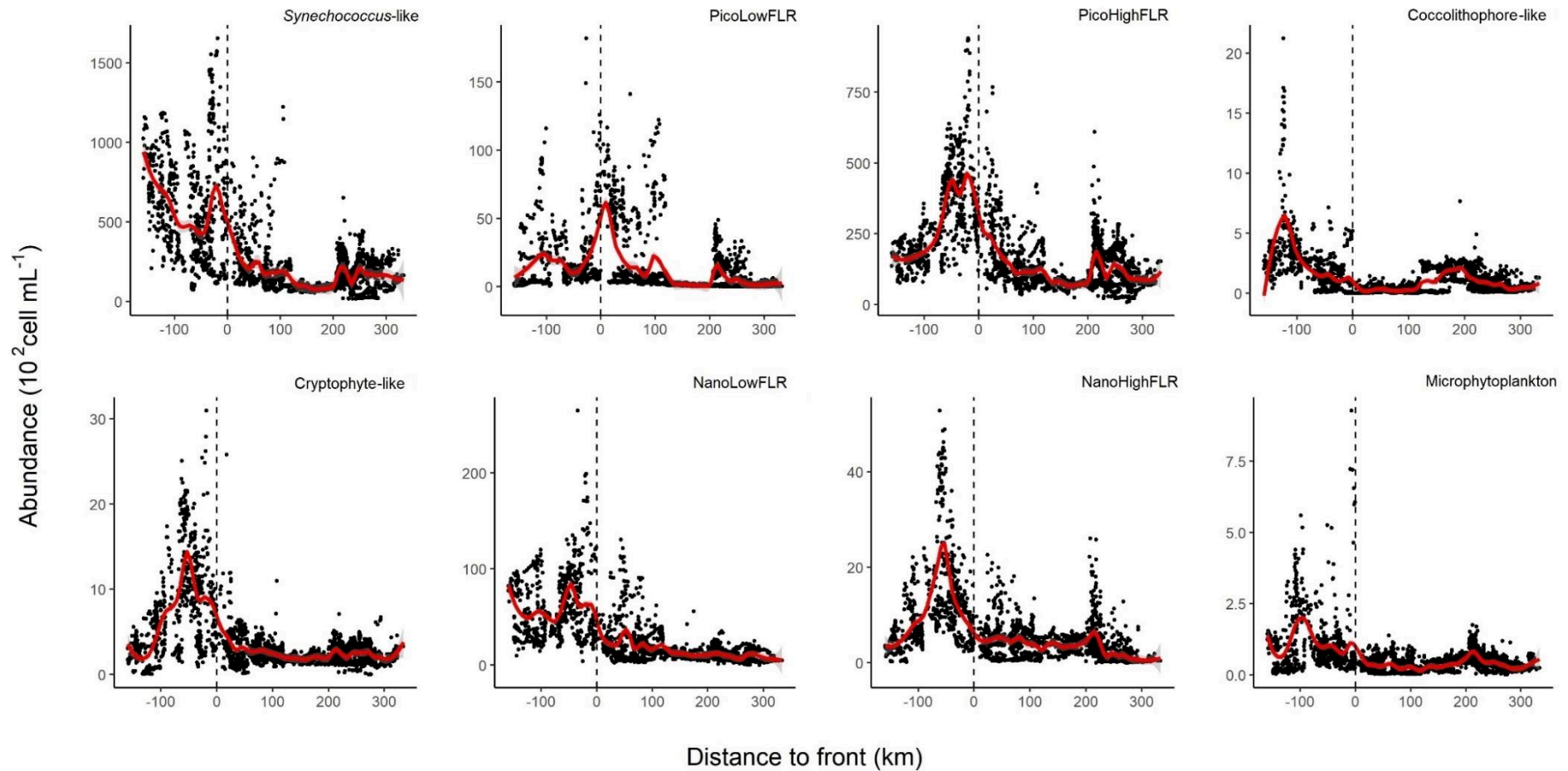


Figure 38 : Distribution of the abundance in relation to the distance to the Ushant front (km) for the eight phytoplankton groups characterised by the CytoSense. The dashed line represents the position of the inner thermal front. Negative distance represents samples at the West of the front. Positive distance represents samples at the East of the front.

### 3.3. Phytoplankton communities structure analysis.

Phytoplankton communities were discriminated after the computation of a hierarchical classification of the quantitative Jaccard index on abundance and red fluorescence (Fig. 39). The Analysis of Similarity (ANOSIM) provided evidence of a spatial clustering of 6 communities ( $R = 0.50$ ,  $P = 0.001$ ). However, due to discontinuity between the community C5, we split C5 in C5a and C5b for the investigation of the spatial scale analysis. C1 and C2 were characterised in offshore waters between WEC and CEC (mainly eastern offshore part of WM1 and offshore WM2). C3 was found in the Central English Channel and characterised also the Eastern part of the Bay of Seine (BOS), mainly WM2 and WM5. C4 was located by the inner thermal front (Fig. 36B). C5 community was found in the Western part of the BOS (WM4; C5a) and also in the French part of the WEC (WM3; C5b). C6 corresponded to most of the WEC offshore waters (WM3) including external Channel stations (western part of WM1).

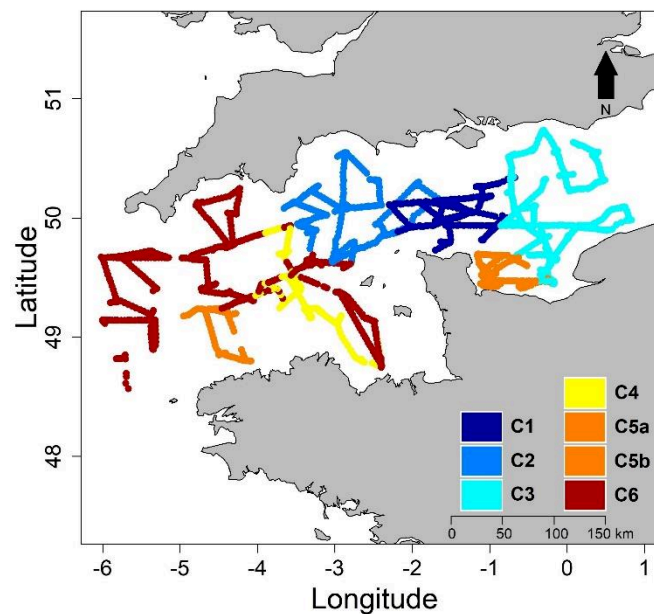


Figure 39 : Phytoplankton communities based on the results of the fusion between Jaccard similarity matrice on the abundance and red fluorescence.

Heterogeneity was supported by the values of the coefficient of variance (CV) calculated for each group, in addition, to minimum, maximum of abundance and total red fluorescence (further details in annex II). In terms of abundance (Fig. 39), phytoplankton communities were all dominated by the *Synechococcus*-like group (47% in C5 to 61% in C6 to the total abundance). Picoeukaryotes (*i.e.* PicoLowFLR and PicoHighFLR) groups represented the second most important groups (Fig. 39). However, in C1, C2, C3 and C5, the PicoLowFLR (36% in C3 to 43% in C5) dominated over the PicoHighFLR (1% in C1, C2 and C3 to 3% in C5) whereas in C4 and C6, the PicoHighFLR (24% and 34% respectively in C4 and C6) dominated over the PicoLowFLR (7% and 13% respectively in C6 and C4). On the other hand, the total abundance of nanoeukaryotes was always low (at most they represented 11% of the total abundance for C1). The most abundant nanoeukaryotes group was NanoLowFLR (3% in C3 and C4 to 7% in C1). In C2, the Cryptophyte-like cells total abundance was the double than in any other assemblages. The most important contribution of the Coccolithophore-like cells was found in C1 (1%) whereas in the other communities they accounted for less than 1%. Finally, the total abundance of the microphytoplankton in every community was below 1%.

Although small photoautotrophs significantly dominated abundance (Fig. 39) in both WEC and CEC during the cruise, the contribution of nanoeukaryotes and microphytoplankton to total red fluorescence, which is an estimation of chlorophyll *a* fluorescence (Haraguchi et al., 2017), was important (annex II, Fig. 39). The relative contribution of the Coccolithophore-like cells to the total red fluorescence was almost seven times higher in C1 than in any other community. On the other hand, nearly half of the total red fluorescence in C3 and C4 was attributed to *Synechococcus*-like and picoeukaryotes groups (C3: 49% and C4: 50%). This was higher than in the other communities (range between 25% in C6 to 34% in C1 and C2). In C1, C2, C3 and C5, Cryptophyte-like cells total red fluorescence represented the double (12-13%) of what they represented in C4 and C6 (respectively 5% and 6%). In C3, C4 and C6, NanoLowFLR

contribution to the total red fluorescence (respectively C3: 17%; C4: 27% and C6: 32%) was higher than the contribution of the NanoHighFLR (C3: 8%; C4: 13% and C6: 29%). We noticed the opposite pattern in C1, C2 and C5. Despite the low abundance of the microphytoplankton group, the contribution to total red fluorescence of this group was comprised between 4% (C4) and 15% (C1).

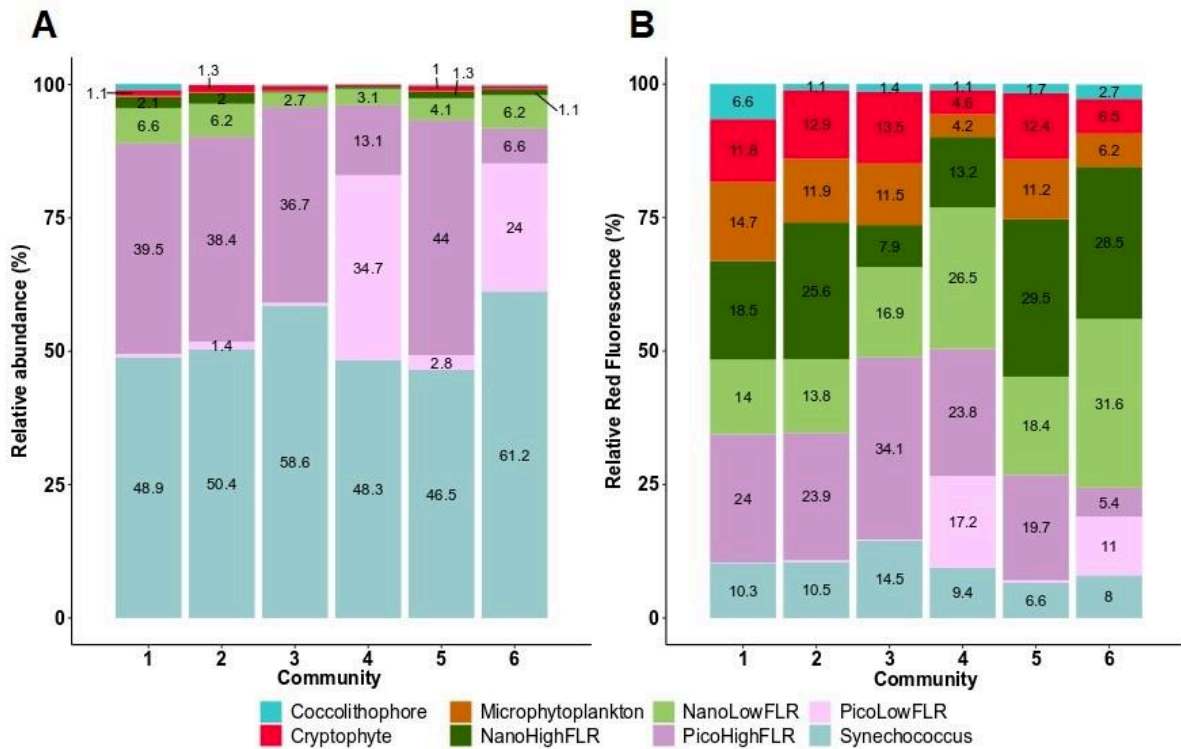


Figure 40 : Relative contribution of phytoplankton, A. abundance and B. total red fluorescence, within each community. Only the percentage above 1% are displayed.

Although we observed an heterogeneity in total red fluorescence per cluster, the CytoSense provided us with information on single-cell level features (Fig 41). Therefore, working at the individual level led us to study the population variability considering a cytometric-derived trait. Here, we first focused on the red fluorescence per cell and then on the cell-size. Different spatial patterns of red fluorescence per cell and cell size were observed, per group, among the communities. *Synechococcus*-like red fluorescence per cell remained unchanged in all the communities despite changes in cell size and abundance (Fig. 41A and 40B). Cell size was

significantly different between all the communities identified ( $p < 0.01$ ). Both picoeukaryote groups (*i.e.* PicoLowFLR and PicoHighFLR) exhibited the most important red fluorescence per cell in C4 and C6 than in the other communities ( $p < 0.05$ ). For the PicoLowFLR, the community comparison showed a large range of abundance within an order of magnitude of  $10^2$  cell mL<sup>-1</sup> whereas red fluorescence level remained between 200 and 400 a.u. cell<sup>-1</sup> (Fig. 41A). An increase in the red fluorescence per cell was observed with an increase of the cell size (Fig. 41B). On the contrary, for the PicoHighFLR, high red fluorescence levels were consistent with low abundance (Fig. 41A) and different relation between red fluorescence and cell size were observed (Fig. 41B). Small cell with high red fluorescence levels were found in C4 and C6. Small cell with low red fluorescence were found in C1, C2 and C4 and large cell with some level of red fluorescence were found in C3. Concerning Cryptophyte-like cells and Microphytoplankton groups, the highest red fluorescence values per cell were found in C5 and C6 and were significant ( $p < 0.05$ ). In these communities, the Cryptophyte-like cells exhibited also the highest abundance (Fig. 41A and 41B) and their cell size was significantly larger in C4, C5 and C6 than in C1, C2 and C3 ( $p < 0.05$ ). Coccolithophore-like cells showed higher red fluorescence per cell in C2, C4 and C6 than in C1, C3 and C5. Moreover, the highest values of red fluorescence per cell were observed for NanoLowFLR and NanoHighFLR in C4, C5 and C6. Finally, larger cell size was recorded in C4, C5 and C6 than in C1, C2 and C3 for PicoLowFLR, Coccolithophore-like cells, NanoLowFLR and NanoHighFLR, but no pairwise assemblage was significantly different. The log-log relation between red fluorescence and orange fluorescence, per cell, showed an increase in fluorescence emission with the cell size (Fig. 41B). In addition, there was an increase in the red and orange fluorescence emission as the cell size increases (Fig. 41D) despite the standard deviation showed large variation for the orange fluorescence.

For red fluorescence, three orders of magnitude were recorded from the smallest (*Synechococcus*-like cells) to microphytoplankton cell size. *Synechococcus*-like and Cryptophyte-like cells could be characterized by a higher orange over red ratio from the other groups. However, not all groups subscribed to this relation. Indeed, the figure 41B showed that some groups exhibited a change in size but not in red fluorescence per cell (range of the standard deviations). This occur in specific communities or in each community. For example, PicoHighFLR exhibited a large range of cell size and red fluorescence in C6 and C1 whereas the size and the red fluorescence were fluctuating irrespective to each other in the rest of the communities. Such patterns were also observed for the Coccolithophore-like cells. This relation would mean that in some case the red fluorescence per cell is independent of the size of the cells. As chlorophyll *a* fluorescence reflects the endogenous concentration of this pigment, the relation between red fluorescence per cell and cell size may result different intracellular pigment composition (Álvarez et al., 2017). On the other hand, the other groups (*i.e.* *Synechococcus*-like cells, PicoLowFLR, nanoeukaryotes, microphytoplankton and Cryptophyte-like cells) tended to show a balance between the size and the red fluorescence, the larger a cell was, the more red fluorescence it would emit. Finally, the range of the standard deviation in red and/or orange fluorescence emission showed that the emission of red fluorescence per cell within PicoLowFLR, PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, Cryptophyte-like cells and Coccolithophore-like cells groups were not proportional to the emission of orange fluorescence per cell. On the contrary, the emission of red fluorescence per cell was proportional to the emission of orange fluorescence per cell concerning *Synechococcus*-like cells and Microphytoplankton (Fig. 41D).



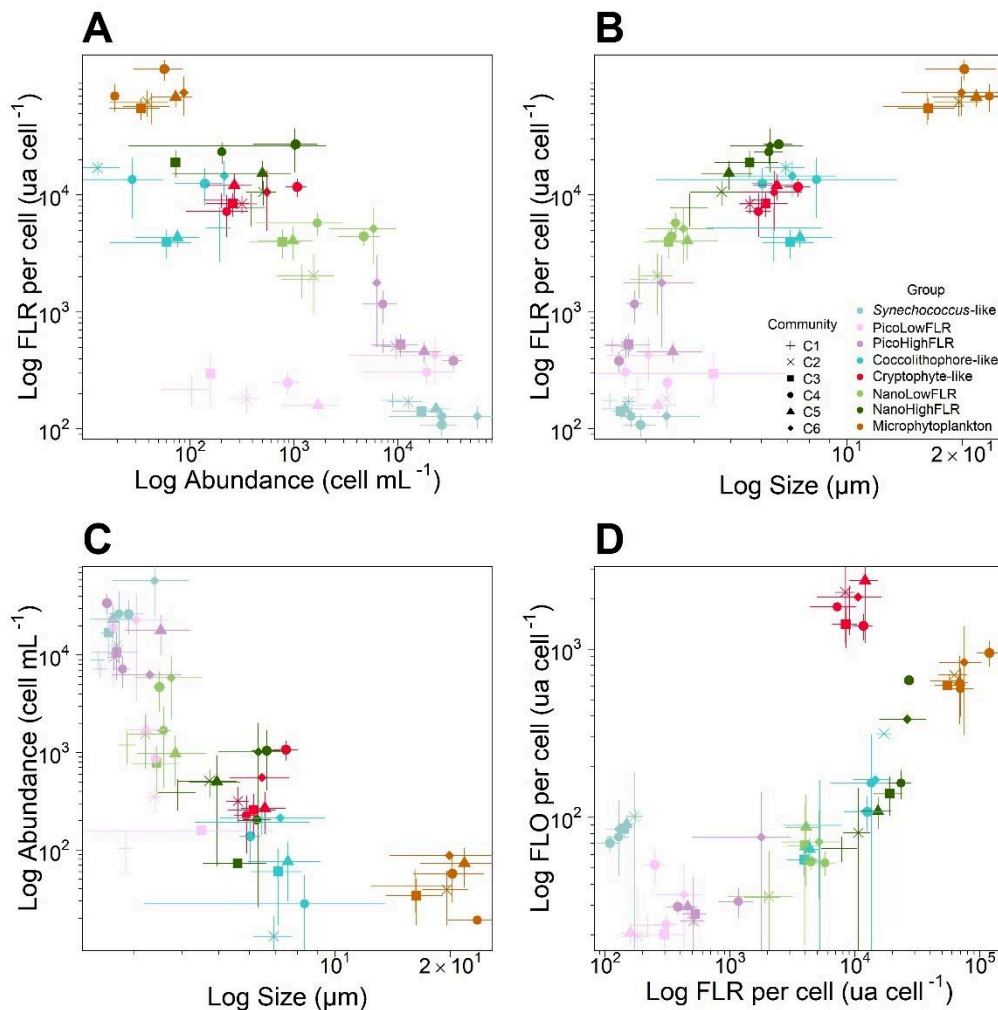


Figure 41 : Patterns in size structure and fluorescence of phytoplankton groups amongst different communities defined in the English Channel. A. Log-log relationship between phytoplankton abundance and the red fluorescence per cell, per group and per community, B. Log-log relationship of the red fluorescence per cell (FLR) against the phytoplankton size scaling per group and per community, C. Log-log relationship between phytoplankton cell size and abundance per group and per community, D. Log-log relationship of the orange fluorescence per cell (FLO) against the red fluorescence per cell (FLR) per phytoplankton group and per community.

### 3.4. Variance partitioning

Results of the variance partitioning (pure spatial, pure environmental, interaction between environment and space and unexplained variance) of the whole phytoplankton community and of each of the six assemblages were summarized in table 7. Such analysis revealed that spatial (PCNM spatial descriptors) and environmental variables (temperature, salinity and turbidity)

accounted for 65% of the total variance on the whole cruise. The 35% of the residual variance (*i.e.* unexplained variance) were explained by other factors than environmental variables and space (*e.g.* biological processes such as grazing, infection without interaction with the environmental data; Table 7). The spatial descriptors (based on the spatial coordinates of sampling points) were more important than the environmental variables (<5% for all the groups) in structuring the abundance and total red fluorescence of each group. The spatial descriptors ranged between 24% (Coccolithophore-like cells) and 34%-36% (all the other groups). The results were provided in the annex III. Focusing on the communities, the spatial variation of the assemblages was higher than the environmental variation within C1, C2, C3, C5 and C6. In community C4, the environmental variation accounted for 45% and was similar to the spatial variation which accounted for 43%. Then, the spatially structured environment (*i.e.* interaction) accounted between 13% (C1) and 46% (C6) of the total variation. Finally, considering the six communities identified (C5a and C5b are merged), both spatial and environmental variables accounted for a significant amount of variation except for the effect of the interaction between environment and space in C1. The sum of pure spatial, pure environmental variables and their interaction explained from 40% (C1) to 74% (C6) of the total variation in the communities. Therefore, the percentage of unexplained variation in the phytoplankton assemblages was comprised between 26% (C6) and 60% (C1).

Tableau 7: Variation partitioning of phytoplankton community (Environment including temperature, salinity and turbidity; space including abiotic interactions, physical processes and unexplained environment).

	Environment		Space		Interaction		Residual
	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	
All	0.26	0.001	0.65	0.001	0.26	0.001	0.35
C1	0.15	0.001	0.25	0.001	0.13	0.06	0.60
C2	0.19	0.001	0.51	0.001	0.16	0.001	0.47
C3	0.59	0.001	0.60	0.001	0.43	0.001	0.34
C4	0.45	0.001	0.43	0.001	0.36	0.001	0.49
C5	0.35	0.001	0.44	0.001	0.27	0.001	0.48
C6	0.50	0.001	0.70	0.001	0.46	0.001	0.26

### 3.5. Scale of variability of phytoplankton communities

The multivariate Mantel correlogram based on the abundance and the average total red fluorescence per cluster revealed phytoplankton communities' spatial pattern by computing the geographical distance between pairs of sites in each community (Fig. 42). The Mantel correlogram indicated the highest autocorrelation at nearer distances, with a decrease and always reaching negative values at farther distances (but not always at the same distance). Because C5 community was not spatially continuous, C5 community was split into C5a (Eastern Bay of Seine) and C5b (South-Western of the WEC) sub-groups. The highest autocorrelation was found in C4 and C5b ( $r=0.34$  and  $r=0.40$ , respectively). Phytoplankton assemblages showed a positive spatial autocorrelation between 20 km (C5a) and 110 km (C6, Fig. 42). This meant that phytoplankton composition became more different when the autocorrelation reached null or negative values. The definition of the spatial scale resulted in the combination of high correlation for the nearer distances and the quick decrease of the correlation when the distance increased. Here, the results suggested a high spatial structure at sub-mesoscale (<10 km) up to 110 km. This analysis confirmed the results of the partitioning variance analysis which mentioned that space had a great influence in structuring the assemblages.

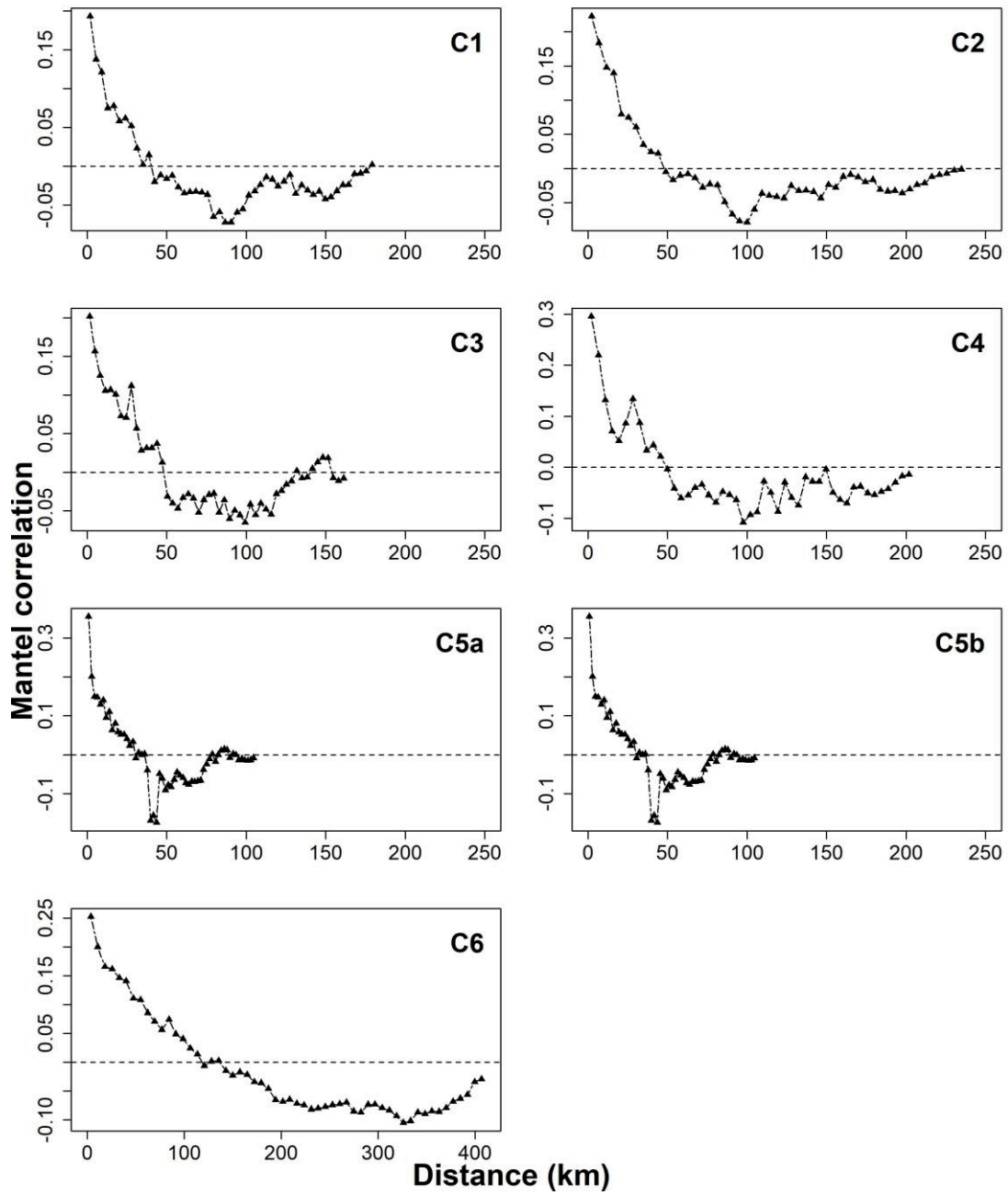


Figure 42 : Mantel Correlogram of pairwise similarity in phytoplankton communities (Jaccardized Czekanowski similarity based on the abundance and average total red fluorescence per cluster) against geographical distance (Euclidean distance).

## 4. Discussion

### 4.1. Water masses

Despite the English Channel is a rather well-studied area, only few surveys attempted to characterise the spatiotemporal distribution of physicochemical parameters in the CEC and WEC (Bentley et al., 1999; Charria et al., 2016; Garcia-Soto and Pingree, 2009; Napoléon et al., 2014, 2012). Most studies benefited of long-term coastal monitoring or transect of ships-of-opportunity through a year. In the present study, the focus was put in the whole Western and Central English Channel gridded at a specific period of a year. Although the sampling strategies differed, our results showed similar hydrological areas than previous studies. The water circulation from West to East in the English Channel explained the longitudinal gradient observed during our study especially for the slow salinity decrease (Salomon and Breton, 1993). In addition to this circulation, the vertical stability induced during summer, contributed to the longitudinal gradient of temperature. Along the English coast of the Central English Channel, the high values of turbidity were congruent with continuous run-off from the Solent and were entertained in the gyre of the Southern part of the Isle of Wight (Ménèsquen and Gohin, 2006). During the CAMANOC cruise, strong horizontal gradients of temperature, salinity and turbidity revealed five distinct water masses. The temperature gradient revealed tidal mixing fronts where a strong stratification occurred (Simpson and Nunes, 1981). The stratification of the Ushant frontal area (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Pingree, 1980; Pingree et al., 1975; Pingree and Griffiths, 1978) separated 2 water masses (WM). WM3 corresponded to Western English Channel (WEC) waters displaying mixed water column, lower temperature and higher salinity than the rest of the waters of the outer Channel (shelf front) and the eastern WEC. WM3 was surrounded by stratified waters. The western boundary corresponded to an external front separating warm and stratified waters (Celtic Seas shelf waters) from mixed and cold waters (WM3). At the east, an internal front separated cold and mixed waters (WM3) from warm and

well-mixed waters (WM1). The temperature pattern observed in the offshore waters was not consistent with observation in 2011 (Marrec et al., 2013; Napoléon et al., 2013) but was congruent with negative anomaly observed in 2012 in the northern part of the WEC (Marrec et al., 2014). We explained that by a combination of a relatively higher stability of water in WM3 (low tidal stream) than in the CEC (high tidal stream) and the lower temperature which are supported by air-sea heat fluxes shifting from positive to negative balance during the summer-autumn transition. Thus, the upper mixed layer deepens and water cools down (Hoch and Garreau, 1998). WM1 was characterized by high stable temperature and salinity (Fig. 36B). It might have corresponded to the external front separating the WEC and the Celtic Seas in the Western border and the internal front between the WEC and the CEC in the Eastern border. A latitudinal salinity gradient revealed a salinity front separating WM4 found in the Bay of Seine (BOS) from the CEC waters (WM2). The turbidity gradient separated the offshore waters of the CEC from English coastal waters of Central English Channel (WM5). The low values of  $N^2$  in WM4 (BOS) resulted from permanently mixed waters even under the influence of the runoff of the Seine River (Bay of Seine; French coast) whereas WM5 might have been under the remote influence of the Solent (English Coast), leading to a slight dilution of coastal waters (compared to lower salinities recorded in the Bay of Seine). WM2 could result in intermittently stratified waters (Van Leeuwen et al., 2015) in the continuity of WEC stratified waters.

#### 4.2. Phytoplankton communities

Several studies attempted to numerate phytoplankton assemblages in the whole area of the WEC and CEC but none of them with high spatial (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Napoléon et al., 2014, 2013, 2012) expanded gridding of data or on high temporal resolution (Edwards et al., 2001). Furthermore, in this area, while previous studies focused only on species of the large size fraction of the phytoplankton (*i.e.* microphytoplankton; Napoléon et al., 2014, 2012; Smyth et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010), we were able to detect the

whole size-range of phytoplankton from picophytoplankton (1  $\mu\text{m}$ ) to large microphytoplankton (several millimeters length) in a single analysis. Even though we did not reach a taxonomical resolution, it was possible to address the fine structure of phytoplankton functional groups, as well as some of their traits, during the summer-autumn transition.

In this study, we used the CytoSense parameters derived from the optical features and signatures as cytometric-derived traits at the individual and populational level (Violle et al., 2007) while several studies were applying the same technique and approach in different aquatic ecosystems focusing only one level (Fragoso et al., 2019; Malkassian et al., 2011; Pomati et al., 2011; Pomati and Nizzetto, 2013). The four selected traits (abundance per group, orange and red fluorescence per cell and cell size) showed a spatial heterogeneity for each group, between the communities (Litchman et al., 2010). The cell size was independent of cell's physiology per group between our communities (larger cells and higher average red fluorescence per cell in the community of the WEC, C4 and C6 than in the communities of CEC and BOS, C1, C2, C3 and C5). This result suggests specific responses of the species and/or groups. Indeed, in order to explain the spatial heterogeneity of the traits, we propose three hypothesis: (i) the selection of the optimal traits under biological pressures such as grazing (Litchman et al., 2009); (ii) the plasticity and genetic adaptation of the traits derived from the gene expression in response to environmental variations (Litchman et al., 2010) and; (iii) in the case of the automated "pulse shape" flow cytometry, a group can pool several species with similar optical properties (Thyssen et al., 2008a). Here, as grazers were not recorded continuously, we decided not to discuss about this hypothesis but would rather investigate the two others.

First, we suggest that the main drivers of the spatial variations are the temperature and the vertical stability of water masses. The results showed that PicoLowFLR group, Cryptophyte-like cells, nanoeukaryotes and microphytoplankton of the communities characterizing stratified and warm waters (C4) and mixed and cold waters (C6) exhibited the largest average cells size

and the highest red and orange fluorescence per cell. Because the optimum for growth range of both nanoeukaryotes and microphytoplankton is relatively low, the colder temperatures measured in WM3, characterized mainly by C6, might have contributed to enhance their metabolism, hence, their size (Marañón, 2015). On the contrary, despite small phytoplankton (picophytoplankton) are dominant everywhere at this period, their growth is facilitated in water masses exhibiting high temperature values (C1 to C5, all WM except WM3). Indeed, their temperature optimum for growth range is higher than nanophytoplankton and microphytoplankton optimum growth range and should favor them in those conditions. Thus, in water masses exhibiting cold water, we expect a dominance of larger cell size whereas in warmer waters a dominance of the smaller cell size within a group. Although, nutrient and grazing rate were not available at the same spatiotemporal resolution as the biological data, we are aware that both play a role on cell size as well as their physiology. In the first case, the growth of small cells (*i.e.* *Synechococcus*-like cells and picoeukaryotes) is favored against large cells (*i.e.* microphytoplankton) under low nutrient condition (usually from the end of the spring bloom to fall). Then, biological interactions (grazing, parasitism) are usually to impact cell size (Bergquist et al., 1985; Marañón, 2015) and physiology (Litchman, 2007; Litchman et al., 2010; Litchman and Klausmeier, 2008). Finally, size overestimation of *Synechococcus*-like cells and picoeukaryote (Fig. 41) results of technical drawbacks of flow cytometry. It is attributed to the halo effect of the laser which increased as particle were increasingly smaller than the width of the laser beam (*i.e.* 5 $\mu$ m).

The heterogeneity of environmental conditions within a water mass affect the expression of the traits within each group. For example, the Coccolithophorids are known to prefer warm and stable waters (WM1) for their growth. Here, the PSFCM detected high total abundance of this group in the Celtic Seas shelf, out of the English Channel (WM1, Fig. 37 and 38) which are dominated in this range of abundance by *Emilinia huxleyi* (Garcia-soto et al., 1995). On the



contrary, microphytoplankton (including some diatoms and dinoflagellates) are known to grow and exhibit higher size in cold waters, turbulent system, rich in nutrient. This explanation is also true for the nanoeukaryotes (*i.e.* NanoLowFLR and NanoHighFLR). This is congruent with the WM3 and WM4 being influenced by the Seine river (C5) and both by the Atlantic Ocean waters and the Seine River (C3). They both contribute to provide nutrients. In addition, the low vertical water stability observed in the coastal communities (along the French coast of Brittany, Bay of Seine) could increase small-scale turbulence which might be positive for some groups (microphytoplankton, Cryptophytes-like, nanoeukaryotes) by increasing nutrient transport (Karp-Boss et al., 1996).

On the other hand, all the groups exhibited different levels of red and orange fluorescence per cell between the communities, except *Synechococcus*-like cells which showed the same levels across the communities (Fig. 41A, B and D). The fluorescence emission given by each group is dependent on the physiological states of the cells. The quantum yield of the chlorophyll *a* fluorescence (*i.e.* red fluorescence of the PSFCM) and phycobilin and phycoerythrin (*i.e.* orange fluorescence of the PSFCM) is also dependent to the life cycle of the cells leading to high fluorescence for young and efficient cells whereas lysis is decreasing the fluorescence emission. Another point was linked to the atmospheric conditions during the cruise. At the beginning of the cruise (corresponding mainly to communities C6, C5 and C4 in WEC waters), the weather was sunny and without wind, some groups (picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton) showed high variability in orange fluorescence per cell within a single community. The strong light intensity and the high stability might have resulted in the synthesis of photoprotective pigments. However, the change of weather after half of the cruise (while investigating WM3 and C1) might have enhanced the vertical mixing. Therefore, the position of phytoplankton cells of the groups is permanently engendered by the mixing of the water column which do not the induce production of photoprotective pigments.

Finally, the last case concerns the lack of taxonomical resolution of the automated “pulse shape-recording” flow cytometer. Indeed, our number of groups was limited. By sharing similar optical properties, several species are attributed to a same cluster. In WEC waters, flow cytometry surveys showed that picophytoplankton is usually composed of Prasinophyceae and usually dominated by *Ostreococcus sp.* at this period of the year (which are considered as red picoeucaryotes by flow cytometry). In addition, among the cryptophytes, few genera exhibiting a wide size range (between 5 and 19µm) are commonly detected (Marie et al., 2010). Nanoeukaryotes are frequently represented by Haptophytes, Stramenopiles and Chlorophytes. *Emiliana huxleyi* is always reported as the dominant coccolithophore species and is known to bloom in the outer shelf of the WEC (Garcia-soto et al., 1995). In addition, a high diversity of diatoms and dinoflagellates is also observed in the WEC (e.g. Widdicombe et al., 2010). Such taxonomical diversity results also in size diversity which is related to physiological traits (Litchman et al., 2010). Consequently, the pigment expression varies. Here, the variations of the trait’s expression considering the three hypotheses (the plasticity and genetic adaptation of the traits, the selection of the optimal traits under biological pressures and the lack of taxonomical determination by automated “pulse shape-recording” flow cytometry) lead to changes in related traits such as nutrient uptake, cell carbon and nitrogen content within each groups and between the communities. The fact that traits such as the cell-size, abundance and total or per cell red fluorescence per group differed significantly between communities, suggests optimum growth conditions in the recorded abiotic parameters for their growth combined with trade-off in biological pressure and variations of the taxonomical composition.

#### 4.3.Environment vs. spatial variations

We expected a greater influence of environment over space structuring phytoplankton communities in the English Channel. Indeed, abiotic filtering has been shown to play a key-role in shaping phytoplankton assemblages (Cornwell and Ackerly, 2009). However, in the

present study, variation partitioning showed that variability in each community depended more on spatial (25 to 70%) than on environmental (15% to 59%) variation within space inducing significantly the environmental variations (16% to 46%; Table 7). Despite heterogeneity is well reported in other areas and seas (Bonato et al., 2015; Marrec et al., 2018; Thyssen et al., 2015), our study allowed quantifying the importance of space and environment on high frequency flow cytometry. Here, the spatiotemporal study of the phytoplankton communities showed an imbalance between groups over one location, this means that high abundance of a group coincided with low abundance of another group and vice-versa. For example, the highest abundance of Coccolithophore-like cells was observed out of the English Channel, in the Celtic Seas shelf where none of the other groups (except *Synechococcus*-like cells) exhibited highest abundance (Fig. 37). This was observed also for both picoeukaryote groups, the highest abundance of the PicoLowFLR was found where PicoHighFLR abundance was relatively low and vice-versa. NanoLowFLR and NanoHighFLR showed the same trend. As previously shown with temperature and vertical stability, each group might result of the selection by a combination of the best conditions (environmental, physical and biotic interactions) for their growth, metabolism and access to resources thus defining their ecological niche (Ramón Margalef, 1978; Reynolds, 2006, 1994, 1984; Tilman et al., 1982). Despite *Synechococcus*-like cells share the same environmental niche as picoeukaryotes (Chen et al., 2011), we could identify some spots of exclusion on both sides near the Ushant front between *Synechococcus*-like cells and PicoLowFLR and others between *Synechococcus*-like cells and PicoHighFLR which are consistent either with sharing niche (Chen et al., 2011) either with exclusions (Winder, 2009). However, both studies considered only one picoeukaryotes group and analyzed discrete samples while we could characterize at a high spatial and/or temporal resolution two sub-groups in the picoeukaryotes and *Synechococcus*-like cells. Consequently, the characterization of sub-groups may increase the ecological understanding of plankton

functional groups. As previously discussed, phytoplankton traits are also known to partition ecological niche of species or functional groups (Litchman et al., 2010; Litchman and Klausmeier, 2008). Therefore, by extension, cytometry-derived traits (Fragoso et al., 2019; Malkassian et al., 2011; Pomati et al., 2011; Pomati and Nizzetto, 2013) are important to be taken into account when considering the spatial and/or temporal ecological niche of the functional groups.

#### 4.4. Spatial structure analysis

Based on the Mantel correlograms (Fig. 42), phytoplankton communities are autocorrelated from small to large scale (20 km to 110 km), depending on the communities. The highest correlation at nearer distance followed by the decrease in autocorrelation define a stronger structure for closer sampled units. Due to the high spatial resolution between two sampling units (*i.e.* 3.4 km), we state phytoplankton communities to be structured at the sub-mesoscale (1 – 10 km). The local structuration is also supported by the maps of each phytoplankton group (Fig. 37), their distribution with respect to the Ushant front (Fig. 38) and the coefficient of variation (Table 7), which highlighted heterogeneity and sharp shifts of total abundance, confirming a local structuration. This measure on the field was congruent with previous findings using conventional flow cytometry (Martin et al., 2005), remote sensing (d'Ovidio et al., 2010) and modelling (Lévy et al., 2014; Mahadevan et al., 2012). The positive autocorrelation found for each community reflects the size of the patches for communities. Several physical processes are well reported to generate patchiness. Small scale turbulence are well-known to generate patchiness which can concentrate particles and phytoplankton at very small scales (Schmitt and Seuront, 2008). Indeed, Pingree (Pingree, 1980; Pingree and Griffiths, 1978) noticed that the English Channel is characterised by small turbulent and persistent eddies. Because phytoplankton moves passively due to the movements of the fluids, eddies can generate patchiness of phytoplankton and spatial heterogeneity. This is commonly observed in the North

Atlantic Ocean in the Western English Channel and the Bay of Seine (Mahadevan et al., 2012; Ménesguen and Gohin, 2006; Pingree et al., 1978; Salomon and Breton, 1993) as in our study, despite we could not observe the eddies. In the meanwhile, eddies contribute locally to water masses motion, changing the abiotic conditions which allow a niche specialization (d'Ovidio et al., 2010). The association of the front in the Western English Channel and the eddies frequently reported in the area are described to generate sub-mesoscale turbulence (*i.e.* 1 – 10 km; Bracco et al., 2000; Perruche et al., 2011). This latter and the passive transport of phytoplankton cause the important dispersal rates of phytoplankton (Lévy et al., 2014). In our study, figure 34D defined the position of the fronts during the cruise and the figure 37 showed the distribution of each cytometric group with respect to the inner front. The dispersal rates reflected here the heterogeneity in abundance around the front. Moreover, the English Channel is highly hydrodynamical, exhibiting a heterogeneity between French and English coasts, Bay of Seine and offshore waters in the strength of the tidal stream. This component also induces the strength of the dispersal rate. Finally, high variability in each group's traits, inside each community, may also result in the spatial variation of the strength of the dispersal, which increased the plasticity (Sultan and Spencer, 2002; Via and Lande, 1985) thus the variability of their traits (Litchman et al., 2010).

## **5. Conclusion**

In the present study, six phytoplankton communities were characterised based on the contribution of each of the eight defined cytometric groups and their optical features and signatures, total abundance and chlorophyll content. These optical features can be, to some extent, associated to life traits, from coastal to offshore waters, where long term regular monitoring does not exist. Phytoplankton and their derived traits were strongly dependent on the hydrology but, most of the times, the communities were even more structured by the spatial descriptors. They include parameters which are not taken into account in the environmental part

such as positive and negative biological interactions, other unmeasured environmental parameters, physical processes. Mantel correlogram made possible to identify phytoplankton communities' variations at the sub-mesoscale (1 – 10 km) in the English Channel. Physical parameters were proposed to explain these variabilities, by structuring the hydrology (different water masses) as well as phytoplankton communities, which were not always associated to a single water mass. Further work should investigate the traits responses to the environmental conditions by applying high frequency flow cytometry in a regular basis, if possible, connected to automated hydrological and biogeochemical measurements at high frequency, on a seasonal and interannual basis. We could therefore define an extended phytoplankton typology within the English Channel including all size classes and also their corresponding traits. This work requires analysing data from the three tables (species or functional groups, environment and traits) and have already been proposed for automated flow cytometry in previous studies (Breton et al., 2017; Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013) and should be generalized from individuals to the community level.

### **Acknowledgments**

This work was carried out in the frame of the M.Sc. FOGEM (Université du Littoral-Côte d'Opale and Université of Lille) internship co-funded by the Laboratory of Oceanology and Geosciences and the “Pôle Environnement, Milieux Littoraux et Marins” of ULCO. At present Arnaud Louchart benefits of a PhD grant of the Université du Littoral-Côte d'Opale and the French Region « Hauts-de-France ». The CAMANOC cruise was funded by the DFF project. We would like to thank Morgane Travers, P.I. of the CAMANOC cruise, the scientists involved, as well as the Captain and the crew of the R/V Thalassa (IFREMER).



## **Chapitre IV : Niches spatialisées des groupes phytoplanctoniques en Manche orientale - sud de la Mer du Nord, en situation de bloom printanier**

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le front d'Ouessant a une grande influence dans la structuration spatiale des communautés phytoplanctoniques en Manche occidentale. Les descripteurs spatiaux, c'est-à-dire les paramètres biotiques (interactions inter- et intragroupes) et abiotiques (forçages physiques liés aux fronts, dispersion) ont une influence qui est plus importante que celle des paramètres environnementaux (température, salinité, turbidité) sur la structuration. Les paramètres physiques (fronts, eddies, tourbillons), très importants dans la zone étudiée, ont alors été testés comme étant les principaux facteurs de la distribution. Néanmoins, il existe aussi d'autres facteurs à prendre en compte. En effet, les paramètres intrinsèques à chaque groupe phytoplanctonique vont aussi conditionner leur occurrence, abondance et distribution spatiale en relation avec l'environnement *sensu lato*. Dans ce chapitre, il est question d'étudier certains de ces paramètres intrinsèques et notamment de définir les niches écologiques des groupes fonctionnels. Il est plus particulièrement question de la spatialisation de ces niches pour chacun des groupes fonctionnels caractérisés pendant les blooms printaniers en Manche orientale et sud de la Mer du Nord. Cette étude fera l'objet d'une soumission prochainement dans le numéro spécial JERICO-NEXT de la publication *Ocean Sciences*.



### Résumé

Les milieux côtiers représentent une zone de transition entre l'océan ouvert et les écosystèmes continentaux et sont économiquement très importants. Les forçages naturels et les pressions anthropiques y influencent continuellement les processus hydrologiques, géochimiques, géologiques et biologiques suivant la durée et l'étendue spatiale à laquelle ces pressions apparaissent. La variabilité spatio-temporelle de ces processus façonne alors la manière dont les organismes, populations et communautés répondent aux conditions de leur habitat, cet habitat étant lui-même formé par la niche écologique de chaque groupe fonctionnel composé d'espèces aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et fonctionnelles similaires.

En milieu côtier, les efflorescences phytoplanctoniques durent la plupart du temps d'une à plusieurs semaines, ce qui implique des changements dans la composition des communautés avant, pendant et après, matérialisés par des fluctuations d'abondance et de biomasse absolue et relative de chaque composante des communautés observées. Le fort hydrodynamisme pouvant caractériser ces zones, comme c'est le cas en Manche orientale et sud de la Mer du Nord, font que les stratégies d'échantillonnage pour le suivi régulier de la dynamique phytoplanctonique (prélèvements discrets à faible résolution spatiale, à fréquence hebdomadaire, bimensuelle ou mensuelle) peuvent manquer des événements brefs et rares tels que le démarrage ou la fin d'efflorescences de longue ou courte durée, mais également leur localisation et extension spatiale. Ces omissions peuvent biaiser l'interprétation de leur importance dans les réseaux trophiques et les cycles biogéochimiques et conduire à des mesures insuffisantes dans le cas d'efflorescences d'algues nuisibles ou d'espèces rares (ou non indigènes). Il est néanmoins possible de pallier à ces potentielles limitations en augmentant la fréquence de ces échantillonnages. De plus, la plupart des études se focalisent sur des fractions du spectre de taille du phytoplancton et bien souvent sur des échantillons fixés. Il s'agit dans cette étude de caractériser les niches spatiales des groupes phytoplanctoniques observés dans

des zones à fort hydrodynamisme, la Manche orientale et le sud de la Mer du Nord lors des efflorescences printanières de fin avril 2017 à mi-mai 2017 sur un suivi spatio-temporel initié en Manche orientale puis allant progressivement au nord, vers le sud de la Mer du Nord et jusqu'à aux embouchures avec la Mer des Wadden afin de suivre le développement des blooms printaniers de diatomées et de *Phaeocystis globosa*. Pour contrecarrer les limitations énoncées ci-dessus, une approche *in vivo* et en continu a été privilégiée, permettant de considérer l'entière des classes de taille du phytoplancton de par l'utilisation d'un cytomètre en flux automatisé de type « pulse shape-recording » avec acquisition toutes les 10 minutes ce qui a permis d'atteindre une résolution spatio-temporelle fine. Trois objectifs ont été définis :

- 1) Caractériser la distribution des groupes fonctionnels phytoplanctoniques définis par cytométrie en flux (PFG) à fine résolution spatiale et temporelle, pendant le développement des blooms printaniers en Manche orientale et sud de la Mer du Nord,
- 2) définir quels sont les groupes qui influencent le plus la composition des différentes communautés rencontrées de leurs changements en terme d'abondance au sein des différentes masses d'eaux définies,
- 3) définir comment les PFG s'arrangent entre eux au sein des communautés à partir des paramètres de leur niche écologique.

Les objectifs décrits ci-dessus ont été étudiés via trois groupes d'analyses statistiques : 1) des analyses spatialisées qui ont permis la définition des masses d'eaux en se basant sur les paramètres abiotiques ainsi que le calcul de la Contribution Locale à la Diversité Beta (LCBD) et de la Contribution des Espèces à la Diversité  $\beta$  (SCBD) ; 2) des analyses multivariées pour l'estimation des niches écologiques spatialisées des groupes phytoplanctoniques, ainsi que la détermination du degré de chevauchement de leurs niches ; 3) l'utilisation de régressions beta pour modéliser l'abondance et la distribution des PFGs.

Les masses d'eaux ont été définies à partir d'un set de quatre variables environnementales disponibles en continu : température, salinité, distance à la côte et la bathymétrie. Dans un premier temps, les données sont standardisées, centrées et réduites pour chaque variable. Les variables standardisées sont utilisées en entrée pour calculer une matrice sur la base d'une distance euclidienne. La méthode de Ward est utilisée pour l'agrégation dont le but est de limiter la variance totale au sein d'un cluster. Le nombre optimal de clusters est obtenu par le critère de classification de Calinski-Harabasz.

Les variations dans la composition des communautés ont été étudiées via la diversité  $\beta$ . Cette diversité  $\beta$  peut être divisée en deux indices : la Contribution Locale à la Diversité Beta (LCBD) et la Contribution des Espèces à la Diversité Beta (SCBD). Ecologiquement, les coefficients de LCBD sont des indicateurs de comparaison de la singularité écologique des sites en terme de composition des communautés. Les valeurs élevées de LCBD définissent les sites avec une composition « inhabituelle » par rapport à la composition moyenne des sites considérés dans l'étude ou une composition pauvre par rapport à une valeur moyenne, c'est-à-dire, un groupe très abondant par rapport aux autres au cours de l'étude. La contribution relative d'une espèce (ici, un groupe phytoplanctonique) à la diversité  $\beta$  est appelée SCBD. Les coefficients de SCBD représentent le degré de variation des espèces au sein de la zone d'étude. Dans l'étude présentée ici, les LCBD et SCBD sont calculées à partir d'un tableau d'abondance transformé par la distance de Hellinger, pour limiter l'importance accordée aux groupes les plus moins abondants. La significativité des résultats de la LCBD est obtenue via 1000 permutations aléatoires et indépendantes. L'étude de la LCBD au sein de chaque masse d'eau permet de montrer quelles sont les masses d'eaux ayant les plus grands changements de composition au cours de l'étude. Par ailleurs, les groupes les plus remarquables dans chaque masse d'eau sont obtenus via la SCBD par masse d'eau.

L'estimation des niches des groupes cytométriques s'effectue par l'analyse multivariée Outlying Mean Analysis (OMI). Elle détermine la réponse des PFGs aux conditions environnementales. La marginalité et la tolérance de chaque groupe cytométrique sont déterminées en calculant la distance entre les conditions environnementales moyennes utilisées par chaque PFG et les conditions environnementales moyennes de la zone étudiée. La définition des sous-niches (qui correspondent aux calculs des paramètres de niche par masse d'eau) passe par la WitOMI qui est un refondement de l'OMI en combinaison avec l'analyse K-select. Ce qui permet alors de définir les sous-niches dans un plan à partir d'une origine commune (i.e. l'origine du plan de l'OMI). Les significativités de l'OMI et de la WitOMI sont testées par permutations aléatoires.

Le degré de chevauchement des niches s'effectue via la différence selon la métrique de Schoener (Schoener, 1970) entre paires de kernel de densité calculée pour chaque groupe cytométrique. L'estimation des kernel de densité se fait sur les deux premiers axes de l'analyse OMI, ce qui représente l'environnement sous forme de grille  $r \times r$  et ce, pour chaque groupe cytométrique ( $r$  est fixé à 100). La comparaison des niches est réalisée par paire de groupes cytométriques via la métrique de Schoener, dont les valeurs varient entre 0 (pas de chevauchement des niches) et 1 (chevauchement total des niches).

Les valeurs de LCBD (considérant ici des PFG) découlant des abondances varient spatialement suivant les paramètres abiotiques. Il est alors possible de modéliser la LCBD par les paramètres abiotiques. Les valeurs réponses étant comprises entre 0 et 1, le choix a été fait d'utiliser des régressions beta. La modélisation des SCBD a été également réalisée par une régression beta. Dans ce cas, les variables explicatives sont les paramètres de niche obtenus via la WitOMI (marginalité et tolérance environnementale).

Onze groupes phytoplanctoniques sont caractérisés dans cette étude selon leur morphologie et leur physiologie : *Synechococcus*-like, PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR, PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, NanoVeryHighFLR, Cryptophytes, Coccolithophores, *Pseudo-nitzschia*, Microphytoplancton. Le picophytoplancton (*Synechococcus*-like et picoeucaryotes autotrophes) et les coccolithophores sont les groupes dominants dans les masses d'eau du large, le long des côtes anglaises en Manche orientale et en baie de Seine. Le picophytoplancton y représente jusqu'à 90% de l'abondance totale. Cette dominance est traduite par une faible marginalité calculée dans l'analyse de niche et définit le picophytoplancton comme ubiquiste dans ces zones tandis que l'analyse de niche montre que les coccolithophores seraient autochtones à la Mer du Nord. Les nanoeucaryotes autotrophes sont présents sous trois groupes (NanoLowFLR, NanoHighFLR et NanoVeryHighFLR) et auraient représenté, d'après des études préliminaires et comparaison avec données microscopiques, les trois stades de vie de *Phaeocystis globosa* (Bonato et al., 2015; Rutten et al., 2005). L'espèce *P. globosa* ainsi que le genre *Pseudo-nitzschia* ont tous deux été observés dans les eaux côtières allant des estuaires de la Somme aux estuaires belgo-néerlandais du Rhin et de l'Escaut ainsi que dans la partie la plus septentrionale de la Mer du Nord, en connexion avec la Mer des Wadden. L'analyse des niches montre que les trois stades de vie de *P. globosa* y sont ubiquistes et *Pseudo-nitzschia* était autochtone aux estuaires de l'Escaut et du Rhin. L'étude des niches écologiques montre que les chevauchements peuvent être relativement faibles (comme entre celles de *Pseudo-nitzschia* et du groupe de picoeucaryotes de faible teneur en chlorophylle *a* PicoLowFLR), pour des groupes qui co-occurrent peu spatialement, alors que les chevauchements de niche peuvent être élevés pour les groupes qui co-occurrent fortement (*Synechococcus* et PicoLowFLR). En outre, l'étude approfondie de la spatialisation des PFGs via la Contribution Locale à la diversité beta (LCBD) permet de montrer les changements dans la composition des communautés définies à partir d'observations à haute résolution spatiale ou temporelle. La Baie de Seine, la côte belge, le nord

des estuaires belgo-néerlandais et les eaux centrales de la Mer du Nord possèdent une composition « inhabituelle » par rapport au reste de la zone étudiée avec une dominance, respectivement, des groupes PicoLowFLR, *Pseudo-nitzschia*, NanoLowFLR et Coccolithophores. Les valeurs de LCBD regroupées par masse d'eau montrent que les masses d'eaux les plus susceptibles à ces changements par rapport à la composition moyenne des sites considérés dans l'étude, se trouvent en Mer du Nord, le long des côtes est. La régression beta de la LCBD montre que 37% de la variation de la LCBD est due à la température, la distance à la côte et la salinité, dont les plus gros changements dans la composition des communautés sont observables à proximité des estuaires au printemps et entraînent les plus gros changements dans les assemblages phytoplanctoniques. La régression beta des SCBD montre la marginalité et la tolérance environnementale de chaque PFG, calculées à partir des variables obtenues à haute résolution spatiale (température, salinité, bathymétrie et distance à la côte), expliquent significativement le modèle à 23%. Les PFGs les plus largement distribués sont plus tolérants aux variations des conditions environnementales et contribuent le moins à la diversité  $\beta$ .



## **Spatial niches of phytoplankton functional groups assessed during a spring bloom development in two temperate coastal seas.**

Arnaud Louchart<sup>1,2</sup>, François G. Schmitt<sup>1</sup>, Elisabeth Debusschere<sup>3</sup>, Jonas Mortelmans<sup>3</sup>, Machteld Rijkeboer<sup>4</sup>, Muriel Crouvoisier<sup>1</sup>, Emeline Lebourg<sup>1</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F 62930 Wimereux, France

<sup>2</sup> Department of Integrative Marine Ecology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, I-80121, Napoli, Italy

<sup>3</sup> Flanders Marine Institute (VLIZ), Wandelaarkaai 7, 8400 Oostende, Belgium

<sup>4</sup> Laboratory for Hydrobiological Analysis, Rijkswaterstaat (RWS), Zuiderwagenplein 2, 8224 AD Lelystad, The Netherlands

Correspondence to: Arnaud Louchart and Luis Felipe Artigas (arnaud.louchart@gmail.com, felipe.artigas@univ-littoral.fr)



**Abstract**

In coastal areas, phytoplankton blooms often last from a week to one or two months. In coastal ecosystems particularly characterized by high hydrodynamics, such as the Eastern English Channel (EEC) and the Southern North Sea (SNS), current sampling strategies (discrete stations sampled weekly, fortnightly or monthly) can miss short-term events as well as the onset or end of blooms, local and/or sub-mesoscale patches and their spatial extension, which can lead to misinterpretations of their importance for trophic networks and biogeochemical cycles, insufficient measures to deal with harmful events. To overcome these limitations, the whole phytoplankton community was addressed following the development of *Phaeocystis globosa* and diatom blooms, from the EEC towards the SNS, from late-April 2017 to mid-May 2017, using an automated continuous recording approach. The aim was to reach a spatial resolution of 1.5 km by analyzing pumped water from 3m-depth with a pulse shape-recording flow cytometer every 10 minutes. The abundance of phytoplankton functional groups (PFGs, defined by optical properties) and the calculation of the Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) permitted to address the spatial segregation of PFGs from the most abundant to the marginal ones. In addition, the occurrence and abundance of the groups were related to niche and sub-niche characteristics obtained by the WitOMI analysis. Coccolithophores were the most abundant group in northern offshore waters of the study area in the North Sea. Picoeukaryotes and *Synechococcus* were especially abundant along the southern coast of England in the English Channel. *Synechococcus* and some picoeukaryotes groups being ubiquitous in these waters whereas Coccolithophores was autochthonous to the North Sea. On the contrary, *P. globosa* and *Pseudo-nitzschia* groups were observed in the brackish waters flowing intermittently and discontinuously (tide- and coastal current-driven) from the Bay of Seine towards the Westerschelde-Rhine-Meuse Region of Freshwater Influence (ROFI) into the Wadden Sea, along French, Belgium and Dutch coasts. The three life-stages of *P. globosa* being ubiquitous

in the southern and eastern coasts of both Eastern English Channel (EEC) and Southern North Sea (SNS). On the contrary, *Pseudo-nitzschia* was autochthonous to the Westerschelde, Meuse and Rhine ROFIs. Contrariwise to the ROFIs on the eastern and southern coasts of the EEC and SNS of the study area, the Thames ROFI was dominated by autotroph picoeukaryotes and presented only few patches of *Phaeocystis globosa*. Finally, the beta regression allowed the prediction of the changes in community composition (i.e. LCBD values) influenced by temperature, salinity and distance to the coast. The biggest changes are more likely to be observed in coastal areas under freshwater influence. Each phytoplankton functional group contributed to the total  $\beta$ -diversity by their niche characteristics. Ubiquitous phytoplankton functional groups occurring in less restricted environmental conditions are more likely to have a small contribution to the beta diversity.

## **1. Introduction**

Species distribution is the core of biodiversity research analyzing species and environmental interactions at different spatial and temporal scales. Nevertheless, the scale of variability of the distribution of a species depends, on a first basis, on the abundance, physiology, size and metabolism of organisms, the characteristics of the ecosystem and the processes to study. In marine ecosystems, coastal and marginal seas represent a boundary between open ocean and continental ecosystems, being economically important as they represent between 22% and 43% of the estimated value of ecosystems services on Earth (Costanza et al., 1997). Hydrological, geochemical, geological and biological processes of the coastal ecosystem are continuously influenced by natural (*e.g.* turbulence, tides, winds, rivers run-off) and direct/indirect anthropogenic pressures (*e.g.* eutrophication, topography modification, contribution to global change) which lead to change the structure and processes according to the timing and spatial extent of these events. In highly hydrodynamic areas, such pressures can generate patches at meso- and sub-mesoscale and make particularly challenging the assessment and understanding

of temporal and spatial distribution of phytoplankton. (e.g. Cullen et al., 2002; Lovejoy et al., 2001; Seuront et al., 1999)

In aquatic and terrestrial ecology, nine hypotheses are often used to describe the relation between distribution and species abundance (Gaston et al., 1997; Gaston and Blackburn, 2007). Four hypotheses are related to data acquisition and data analysis whereas five are related to the ecology of species. Among the ecological hypotheses, habitat use is known to affect species occupancy and abundance because each species has its own niche and consequently may influence spatiotemporal variability of phytoplankton diversity. Species abundance related to their environment is often explained by species niche parameters (*i.e.* niche position and niche breadth). This concept is defined as the environmental space that a species can occupy according to their metabolical requirements and their abiotic parameters. To this, Hutchinson added the n-dimension feature in the fundamental niche where each dimension is represented by a factor of the environment (Hutchinson, 1957). Consequently, spatiotemporal patterns in species diversity should be related to niche parameters. First, Heino (2005) stated that niche hypothesis predicts that species having a marginal niche are less widely distributed (defined in this study as “autochthonous” species) and locally less common than species capable of occurring in average habitat conditions defined by the average environmental parameters used in the study (defined in this present study as ubiquitous species Karasiewicz et al., 2017). Therefore, it is assumed that species having the broader niche (non-marginal niche) have the wider regional occupancy. Secondly, the spatiotemporal index for diversity estimation such as the Species Contribution to Beta Diversity (SCBD) is related to niche position because species occurring in marginal habitats should occur in environmentally more restricted conditions than non-marginal species.

The identification of phytoplankton species is mainly based on morphology and processed by microscopy which misses most cells below 10  $\mu\text{m}$  (Rutten et al., 2005). Moreover, species

occurring in a same community which have similar traits may reveal ‘redundancy’ in ecological functions (Salmaso et al., 2015). As a consequence, using trait-based analysis focusing on individual phenotypes rather than species appear more relevant in understanding ecosystem functioning by avoiding this redundancy (Fontana et al., 2014). Therefore, grouping species together according to similar morphological, physiological and ecological features such as traits defines functional groups (Litchman and Klausmeier, 2008) and reflects a functional diversity within a community. Most of the traits used to characterize the functional groups are morphological and physiological traits and, if required, some taxonomical (Salmaso et al., 2015) and ecological information (e.g. silicifiers/calcifiers) can be added. Recently, studies showed this morphophysiological classification can be obtained using the optical features of the particles (single-cell and colonies) assessed by the “pulse shape-recording” flow cytometer (Fontana et al., 2014; Fragoso et al., 2019)

The Eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea are small but tightly connected areas of the English Channel and North Sea under the influence of Atlantic waters coming from the Celtic Seas, the Atlantic Eastern Shelf waters and from the North of the North Sea. Several rivers contribute to bring freshwater and nutrients into these areas mainly the Seine, the Somme, the Thames and the Westerschelde-Rhine-Meuse estuaries, which inputs form Regions of Freshwater Influence (ROFI). The spread of riverine inflow depends on river flow, tidal and coastal currents, as well as on main winds resulting in French eastern English Channel coasts to a brackish “coastal flow” (Brylinski, 1991). The bottleneck of the Dover Strait, contributes to drift waters towards the North (both brackish coastal waters and offshore Atlantic waters). In spring, phytoplankton biomass increase, benefiting of the winter nutrients stocks and the increase of light intensity. Spring blooms in these systems are characterized by the Haptophyte *Phaeocystis globosa* representing up to 80% of the total biomass (Breton et al., 2000; Seuront et al., 2006), mainly along French, Belgian and Dutch coasts and is preceded,

coupled to (Sazhin et al., 2007) and followed by diatoms blooms (Grattepanche et al., 2011; Schapira et al., 2008). Notwithstanding phytoplankton blooms are highly documented and benefit of long-term regular monitoring at discrete stations sampled weekly to fortnightly, the high hydrodynamical changing conditions experienced by these areas define different scales of variability that might be missed by reference monitoring approaches (Bonato et al., 2016, 2015; Louchart et al., 2020) and thus, generate an alternance of patches of high and low abundance that might remain .

Recently, regular fortnightly monitoring on a discrete station in the EEC and SNS allowed a temporal study of the realized niche of *Phaeocystis globosa* (Karasiewicz et al., 2018). Nevertheless, in this highly hydrodynamical changing area (strong tidal forcing, tidal and haline fronts, ROFIs; e.g. Brunet, Lizon, 2003 ; Brylinski et al., 1996 ; Quisthoudt, 1987 ; Ruddick, Lacroix, 2006 ; Lacroix et al., 2004), studying the niches on discrete monitoring points is hazardous and misses the natural variability. Increasing the frequency of monitoring is necessary to have a more reliable view of the system across spatial and temporal scales. For this purpose, innovative automated techniques were previously used to resolve spatial distribution of phytoplankton communities at high temporal and spatial resolution during the spring blooms either in the EEC or in the SNS (Bonato et al., 2016, 2015; Houliez et al., 2012b; Thyssen et al., 2015).

Here, we aimed at following the spatio-temporal variations of phytoplankton spring blooms of diatoms and *Phaeocystis globosa* at the sub-mesoscale (<10 km) from the Eastern English Channel towards the Wadden Sea in the Southern North Sea and drifted toward the North by tidal currents. For this, we apply an automated pulse shape-recording flow cytometry during on month (21 April 2017 to 18 May 2017) over three international and collaborative cruises (PHYCO-cruise, VLIZ-cruise and RWS-cruise). We address the spatial environmental niches of phytoplankton functional groups, covering the whole size-range of phytoplankton, following

the spring bloom development in highly hydrodynamic areas under anthropogenic inputs. Our goals were: 1) to characterize the phytoplankton functional groups and the communities they are defining, at fine spatial and temporal resolution during the spring bloom development from the Eastern English Channel to the Southern North Sea, 2) to define which are the groups that mostly influenced the composition of the different communities characterized and by their relative changes in terms of abundance between areas, 3) to define how phytoplankton functional groups are arranged between them using their niche characteristics.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Cruises outlines**

Samples were collected during three international collaborative cruises in 2017 (Fig. 43) in the frame of French, Dutch and Belgian national and/or local projects (*i.e.* CPER MARCO for France and Monitoring Waterstaatkundige Toestand des Lands for RWS), also part of the Joint European Research Infrastructure for Coastal Observatories - New EXpertise (JERICO-NEXT) and LifeWatch European projects (H2020). The cruises started in well-established bloom conditions in the Eastern English Channel before their spread in the Southern North Sea waters. From April 21 to 30, 2017, the PHYCO cruise onboard the R/V “*Côtes de la Manche*” (CNRS-INSU, Artigas, 2017) focused on a round trip within the Eastern English Channel (from the Seine River and Portsmouth to the strait of Dover). Then, round-trips were carried out from French (EEC) and Belgian coastal waters (SNS) to English coastal waters by the strait of Dover and the Thames dilution plume during the VLIZ cruise (8 to 12 May 2017) onboard the R/V “*Simon Stevin*” (VLIZ). During the MONISNEL RWS cruise onboard the R/V “*Zirfaea*” (15 to 18 May 2017) a round-trip started from the Rhine, Meuse and Scheldt and went toward the Wadden Sea. Onboard the three cruises, seawater was pumped continuously at 3 m depth through a circulation device and analyzed with an automated pulse shape-recording Flow Cytometer (PSFCM) to track and record phytoplankton cells and colonies every 10 minutes. In

addition, continuous parameters were obtained by the thermosalinometer (PHYCO cruise) and FerryBoxes (VLIZ and RWS cruises).

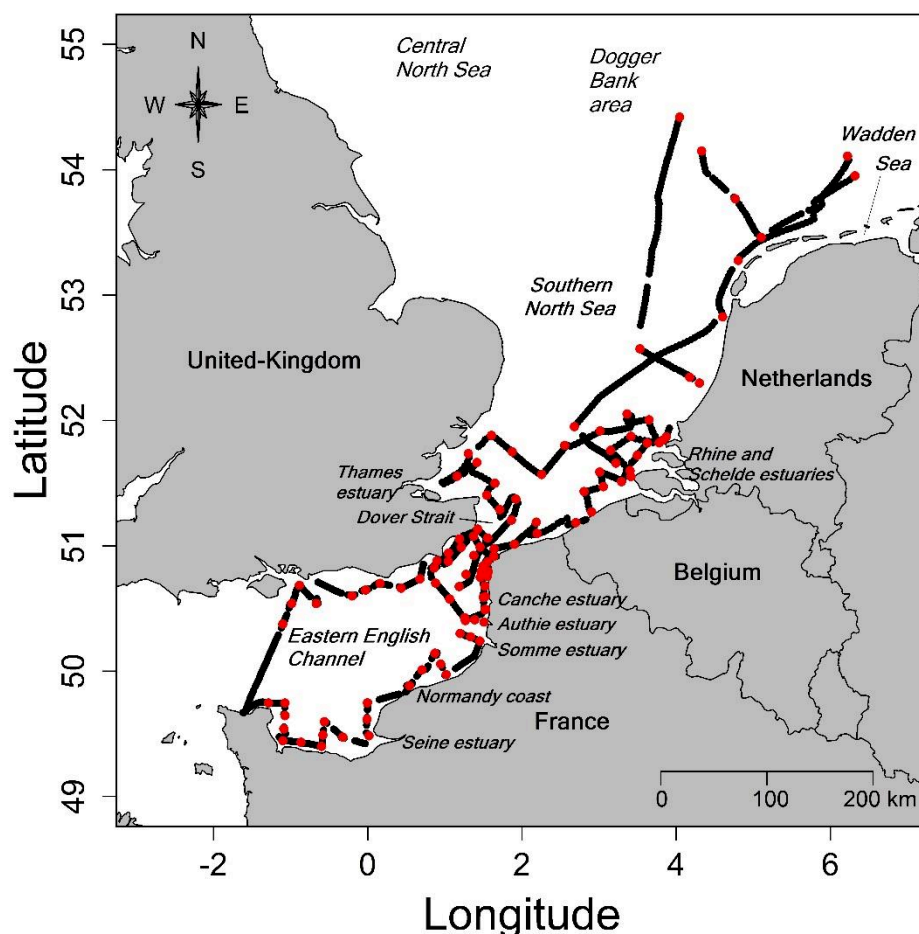


Figure 43 : Studied area of PHYCO (CNRS-LOG), JERICO-NEXT/LifeWatch (VLIZ) and MONISNEL (RWS) cruises in the Eastern English Channel (PHYCO and JN/LW cruises) and Southern North Sea and Wadden Sea (JN/LW and MONISNEL cruises) from April 21 to May 17, 2017. Black dots represent the continuous measurements recorded with the thermosalinometer and the CytoSense flow cytometer. Red dots represent the stations investigated during the three cruises.

## 2.2. Discrete measurements

Samples for nutrient analyses were collected at each discrete station (Fig. 43). Samples were filtered on Whatman GF/F filters and kept frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analyses. Analyses of ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), phosphate ( $\text{PO}_4$ ) and silicates ( $\text{SiO}_3$ ) were

processed by each institute for the respective cruise (CNRS-LOG for PHYCO cruise, VLIZ for VLIZ cruise, RWS for RWS cruise). Nutrients were analyzed according to Aminot and K erouel (2004). Detailed procedure for the RWS can be found in Aardema et al. (2019). In the present study, only ratios between nutrients will be presented as nutrients were analyzed on three different sensors but using the same protocols.

### 2.3. Underway measurements

This study required two types of data sets: phytoplankton and environment. We organized them in two tables. First, the environmental data set included temperature, salinity, bathymetry and distance to the coast. Temperature and salinity were recorded every 15 seconds by a thermosalinometer (PHYCO cruise) or FerryBoxes (VLIZ and RWS cruises). The data were averaged every 10 minutes to match with the phytoplankton data set. Bathymetry was extracted from the General Bathymetry Chart of the Ocean (GEBCO). An R script was written to extract the distance from the coast of each records. The second data set included phytoplankton abundance per phytoplankton functional group defined by flow cytometry analysis using a CytoSub and/or a CytoSense (Cytobuoy b.v., the Netherlands) which are pulse shape-recording flow cytometers (PSFCM). The PSFCM is a powerful technique to analyze, count and characterize single-cells and colonies, *in vivo* and at high frequency, from 1 to 800  $\mu\text{m}$  width and few millimeters length. Our devices record a “pulse shape” (Dubelaar et al., 1999) derived from optical features of each single particle, after passing through a solid-state Sapphir laser (Coherent Inc, 488nm, 50 mV), providing morphological and optical traits that reflect actual physiological traits (Fontana et al., 2018; Fragoso et al., 2019; Pomati and Nizzetto, 2013). The size of particles is addressed and derived from the forward scatter (FWS) after bead correction and was collected by a PIN photodiode. Internal (*e.g.* size of the vacuole) or external (*e.g.* presence of coccolithes) compositions are addressed by the sideward scatter (SWS). In addition, three types of fluorescence are recorded: red fluorescence (FLR; emission: 668 – 734nm),



orange fluorescence (FLO; emission: 604 – 668nm) and yellow fluorescence (FLY; emission: 536 – 601nm). Both fluorescence and SWS are recorded by a set of photomultipliers. We established a low trigger level on the red fluorescence (range between 10 to 14 mV) in order to separate phytoplankton from non-auto-fluorescent particles (Thyssen et al., 2015). Finally, the sensor was equipped with a camera, providing pictures of the largest cells (> 20 µm) allowing coarse taxonomical recognition (Dugenne et al., 2014; Pereira et al., 2018). The CytoClus software (Cytobuoy b.v., the Netherlands) allowed the visualization and characterization of the groups by the combination of features (Length, Total, Maximum) of the five signals recorded (FWS, SWS, FLR, FLO, FLY) mapped in 2-dimensions dot plots. The amplitude and the shape were used to discriminate groups between them. Particles sharing similar optical properties (*i.e.* features and signals) were gathered together using the CytoClus software (CytoBuoy b.v.) by gating a bulk of similar particles. According to the definition given by Reynolds (1997), phytoplankton sharing similar morphological, physiological and/or ecological properties such as calcifiers (coccolithophores) or silicifiers (diatoms) can be grouped together to form what is called Phytoplankton Functional Groups (PFGs). In our case, the different phytoplankton cytometry-defined groups are labelled from their optical characteristics, according to the criteria of the common vocabulary available on SeaDataNet (<https://www.seadatanet.org>). Optical characteristics are based on anatomical, morphological and physiological properties of each cell which reflect some traits of phytoplankton groups. Therefore, we chose to label them as Phytoplankton Functional Groups (PFGs). The main distinction between the PFGs was mainly based on the size (derived from ForWard Scatter) and the level of the red fluorescence (chlorophyll *a* autofluorescence), orange fluorescence (phycoerythrin autofluorescence) and yellow fluorescence (degraded pigments), SideWard Scatter (SWS) of the PFG, which lead to sometimes characterizing sub-groups. We processed also images on a targeted area in the microphytoplankton group for subgroup visual validation. The size of particles was calibrated

by a set of beads of 3 and 10  $\mu\text{m}$  and helped us to define three phytoplankton groups according to the size: Picophytoplankton ( $<1\mu\text{m} - 3\mu\text{m}$ ), Nanophytoplankton ( $3\mu\text{m} - 20\mu\text{m}$ ) and Microphytoplankton ( $>20\mu\text{m}$ ). According to Bonato et al. (2015), the estimated size, obtained by the length FWS of the PSFCM, was corrected by a correction factor (10) obtained by the ratio of real beads size over the measured beads size. Thus, we applied this correction factor to the measured particles size to have the estimated particle size (11).

$$\text{Correction factor} = \frac{\text{Real beads size}}{\text{Measured beads size}} \quad (10)$$

$$\text{Estimated particles size } (\mu\text{m}) = \text{Measured particles size} \times \text{Correction factor} \quad (11)$$

## 2.4. Data analysis

Our three cruises defined a set of phytoplankton functional groups combined into phytoplankton communities. First, we ran the Local Contribution to Beta Diversity in order to highlight the spatial changes in the community functional composition (Legendre and De Cáceres, 2013). Briefly, the LCBD is a comparison of the uniqueness of each site to beta diversity. This analysis considers the species richness and the abundance of each species per site. Therefore, it is particularly suitable for high frequency datasets even though we did not consider species but functional groups. Prior to the analysis, the data were transformed by the Hellinger transformation. This transformation is strongly recommended for abundance data and especially in the use of the LCBD (Legendre and De Cáceres, 2013). For the PSFCM, our groups were found in each place and remained the same in all the sites except for *Pseudo-nitzschia* spp. For which the absence was defined as null abundance. Therefore, the variability in LCBD depended only on the relative abundance of each ecological unit (define here as a PFG) in each site and should highlight changes in community structure (Rombouts et al., 2019). The computation of the  $\beta$ -diversity provided also the Species Contribution to Beta Diversity

(SCBD) which is the degree of variation of individual species (in this case, of a phytoplankton functional group) across the study area. Calculations of both LCBD and SCBD were carried out using the *beta.div* function of the *adespatial* package in R. Within the whole studied area, we defined abiotic areas from high frequency data by a three steps procedure: 1) computation of a Euclidean distance matrix on standardized data (temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry). 2) Processing a hierarchical agglomerative classification by the Ward method. 3) Getting the optimal number of areas when the highest Calinski-Harabasz criterion values was obtained. To determine the community changes between the water masses, values of the total LCBD were averaged within each water mass. LCBD values amongst areas were tested by Mann-Whitney test and Tukey-HSD post-hoc. The calculation of the SCBD within the water masses allow the identification of the PFGs which contributed the most to the changes in term of community composition.

To determine the relation between PFGs and the environment, we calculated the niche position and niche breadth using the Outlying Mean Index (OMI) by following the procedure described by Dolédec et al. (Dolédec et al., 2000), adapted to PFGs. This is a multivariate index which allows the quantification of niche parameters and explaining the variability of species to a selected set of environmental factor (Dolédec et al., 2000; Karasiewicz et al., 2017). Here, niche parameters were established for high-resolution phytoplankton dataset (i.e. abundance recorded by the automated flow cytometer) and calculated using the high-resolution abiotic dataset (i.e. temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry). The OMI provides us, the marginality and its variance part called the tolerance per PFG. A PFG that shows low values of OMI has non-marginal niches and thus occur in common habitats (i.e. everywhere). On the contrary, a PFG that shows high values of OMI has marginal niches and therefore, occur in specific habitats. PFGs that have low values of tolerance have narrow niche breadth whereas, PFGs that have high values of tolerance have a wide niche breadth. The statistical procedure is

detailed in Dolédec et al. (2000). The OMI analysis was conducted using the *niche* function of the *ADE-4* package, establishing the significance value of the relevant indexes at  $p < 0.05$ , based on 1000 random permutations data.

The usual procedure to characterize niche position and niche breadth per subset (sub-niche) until recently was to process several OMI analyses, one per subset. Nevertheless, this method assumed a unique origin of each subset of environmental conditions. In the case of different environmental conditions, the niches' positions vary between the subsets, thus the use of several OMI cannot rely accurately a comparison of the subsets. For this purpose, the WitOMI analysis developed by Karasiewicz et al. (2017) defined a common origin for the overall analysis and an origin for each subset. The calculation of the WitOMI was carried out by the *subniche* function of the R package *sub-niche* (Karasiewicz et al., 2017). Both marginality and tolerance were obtained for the OMI and WitOMI analysis. The marginality is defined as the distance between the mean habitat conditions used by the functional unit and the mean habitat conditions over the entire studied area. The tolerance corresponds to the niche breadth which refers to the variability of the environment used by the functional units. In addition, the residual tolerance is calculated and represents the part of the variance which is not explained by the environment. As species distribution and communities are driven by the environment, both LCBD and SCBD should be related to species (here PFG) characteristics linked to environment. We processed two models with beta regressions: 1) a model with the LCBD as a response to environmental parameters recorded continuously. 2) a model with SCBD as response of species characteristics linked to environment such as niche position and niche breadth. These procedures were applied by the *betareg* function of the *betareg* package.

The last procedure of the niche analysis assesses how the groups are arranged between them. For this purpose, we processed to estimate the niche overlap based on the method of Broennimann et al., (2012). This procedure uses a kernel density estimation (*kde* function of

the *ks* package for R) weighted by the abundance of each group to create an occurrence density for each phytoplankton group. The coordinates of the kernel was set by the first two axes of the OMI analysis (following the procedure of Hernández Fariñas et al., 2015). We set our space grid ( $r \times r$ ) for the kernel with  $r = 100$ . The comparison between two phytoplankton groups were then assessed by the Schoener D metric which quantifies the percentage of commonness between groups (Schoener, 1970). The overlap statistic (12) is given by:

$$D_{1,2} = 1 - 0.5 \sum_{ij} |p_{1ij} - p_{2ij}| \quad (12)$$

Where  $p_{1ij}$  is the relative abundance of group 1 at the site  $ij$  and  $p_{2ij}$  is the relative abundance of the group 2 at the site  $ij$ . A 1-dimension Gaussian kernel density estimation was also processed for each nutrient ratio and each phytoplankton group. They provided the affinity of each phytoplankton group for the nutrient during this snapshot of the year 2017.

Finally, we used the beta regression to model the  $\beta$ -diversity indices (LCBD and SCBD) with the environmental parameters and the niche features. This method is particularly suitable to model the distribution of response variables within the interval [0;1] such as the LCBD and SCBD. We processed beta regression and logit link function in two separate model. First, the LCBD was modelled with 4 environmental parameters as predictors (temperature, salinity, bathymetry and the distance to the shore). We used only these 4 environmental parameters as their high recording frequency match the spatial resolution of the LCBD. The second model used the niche parameters (niche position and niche breadth) as predictors of the SCBD. A reduced model was obtained and produced a pseudo- $R^2$ . The calculation of beta regression was processed on R using the *betareg* package.

### 3. Results

#### 3.1. High frequency flow cytometry

Up to 11 phytoplankton functional groups (PFG) were characterized during the 3 cruises. According to the correction size's formula provided by Bonato et al. (2015) and the common vocabulary in SeaDataNet, we could characterized 4 picophytoplankton, 5 nanophytoplankton and 2 groups larger than 20  $\mu\text{m}$  (*Pseudo-nitzschia* and Microphytoplankton) with a size range from  $1.99 \pm 0.45 \mu\text{m}$  for *Synechococcus* to  $33.45 \pm 10.25 \mu\text{m}$  for Microphytoplankton (table 8)

Tableau 8 : Mean  $\pm$  sd of the size of the eleven phytoplankton functional types during PHYCO, VLIZ and RWS cruise.

Cytometric group	Mean size $\pm$ sd ( $\mu\text{m}$ )
<i>Synechococcus</i> -like	$1.99 \pm 0.45$
PicoVeryLowFLR	$2.48 \pm 0.65$
PicoLowFLR	$2.18 \pm 0.37$
PicoHighFLR	$2.31 \pm 0.42$
Cryptophytes	$5.27 \pm 2.47$
Coccolithophores	$7.06 \pm 2.31$
NanoLowFLR	$4.71 \pm 0.38$
NanoHighFLR	$3.58 \pm 0.78$
NanoVeryHighFLR	$6.11 \pm 2.31$
<i>Pseudo-nitzschia</i> -like	$18.87 \pm 4.78$
Microphytoplankton	$33.45 \pm 10.25$

A strong spatiotemporal heterogeneity in phytoplankton distribution was evidenced (Figure 44). The most abundant groups exhibited up to  $10^5 \text{ cell cm}^{-3}$  including PicoLowFLR (max:  $150903 \text{ cell cm}^{-3}$ ) and NanoHighFLR (max:  $129233 \text{ cell cm}^{-3}$ ). The less abundant groups values never exceeded  $10^2 - 10^3 \text{ cell cm}^{-3}$ , they were Cryptophytes (max:  $2724 \text{ cell cm}^{-3}$ ) and Microphytoplankton (max:  $940 \text{ cell cm}^{-3}$ ). NanoFLR PFGs (NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR) were the dominant PFGs in the Strait of Dover and in French EEC waters under direct influence of Somme, Authie and Canche estuaries (“coastal flow”), in the mouth of the Thames estuary as well as along the Belgian coast, in the Rhine, Meuse and Scheldt (ROFIs) and in the Wadden Sea (SNS). They contributed to more than 50% of the total abundance and often reached up to  $2.0 \times 10^4 \text{ cell cm}^{-3}$ . On the other hand, *Synechococcus*-like

and picoeukaryotes (PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR and PicoHighFLR) were the most dominant PFGs along the English coasts (except the Thames estuary), the Normandy and the Bay of Seine in the EEC and in offshore waters of the SNS, reaching up to 90% of the total abundance (Fig. 44).

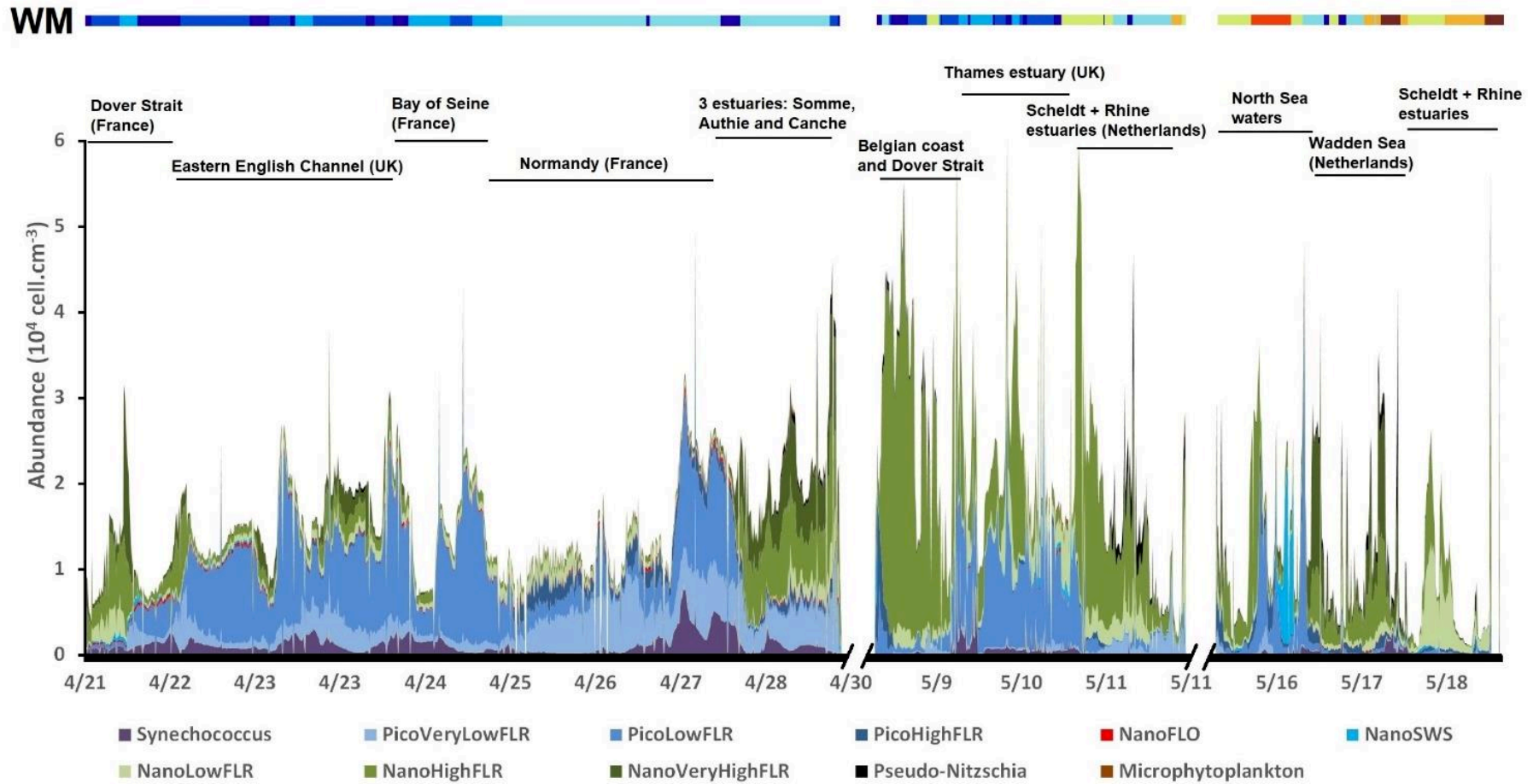


Figure 44 : Spatial-temporal distribution of the phytoplankton groups sorted by the automated pulse shape-recording flow cytometer during the PHYCO cruise (04/21 to 04/30), the VLIZ cruise (05/08 to 05/11) and the RWS cruise (05/15 to 05/18).



Spatial overlaps occurred between cruises, in the Strait of Dover for PHYCO and VLIZ late April and early May cruises, and in the Rhine, Meuse and Scheldt ROFI for the VLIZ and RWS early and mid-May cruises. We highlighted that the spatial structure of the abundance differed from time to time (Fig. 45). In the areas overlapped during cruises, spatial predictors (VLIZ: 77 %; RWS: 90 %) accounted more in the variability of phytoplankton assemblages than time (VLIZ: 17 %; RWS: 49 %) and environment (VLIZ: 19 %; RWS: 37 %). Nevertheless, between cruises (spring time periods), the temporal variability had a is significantly important in the variability of phytoplankton assemblages.

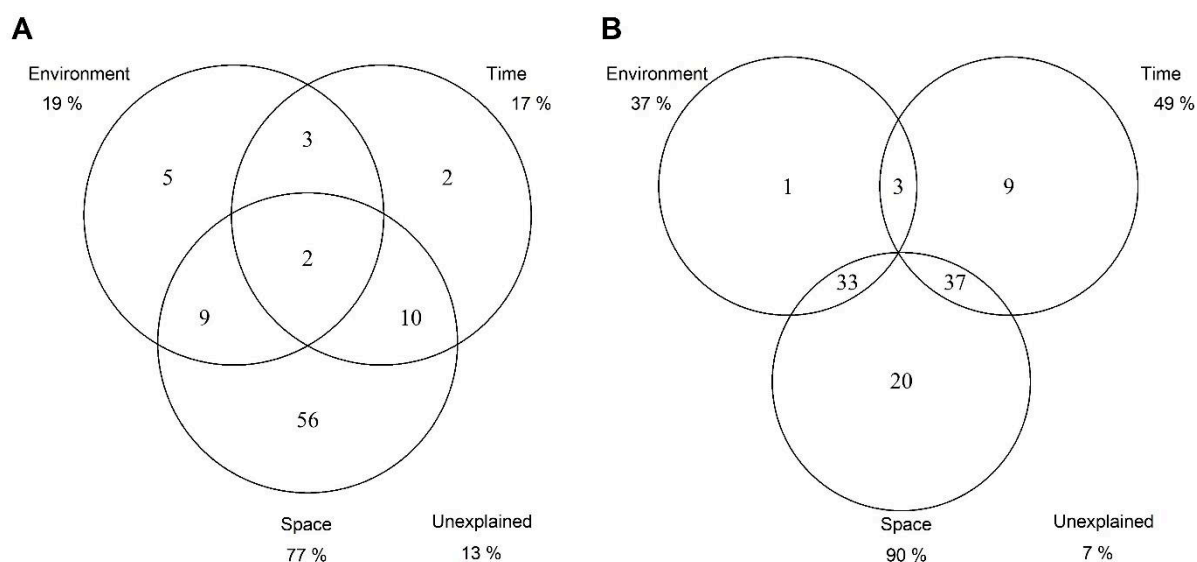


Figure 45 : Variance partitioning of the overlapped areas: A. between PHYCO and VLIZ cruises; B. between VLIZ and RWS cruises

The sites with high and statistically significant values of LCBD (Fig. 46) corresponded to spatial and/or temporal changes or turnover in the PFG assemblage's composition. During the whole sampling period, 6.5% of the sites showed values of  $LCBD > 1.1953 \cdot 10^{-3}$  that were irregularly distributed. Relatively high values were calculated for some locations of the Bay of Seine ROFI during the PHYCO cruise, in some locations of both French and Belgian SNS coasts during VLIZ cruise, by the Scheldt-Rhine-Meuse ROFI and in a spot of offshore waters

of the North Sea (off the Wadden Sea) during the RWS cruise (Fig. 46). The sites of the Bay of Seine exhibited intermediate and significant values of LCBD which were attributed to the large dominance of the PicoLowFLR group. In the Belgian Coastal Zone (BCZ), during the VLIZ cruise, the significant and high values of LCBD were attributed to the increase in *Pseudo-nitzschia* abundance. In the Westerschelde, Rhine and Meuse ROFI, the high and significant LCBD was explained by the increase in the NanoLowFLR contribution to the total abundance. Finally, central waters of the Southern North Sea (at the Northern limit of the SNS) exhibited also high values of LCBD and corresponded to a large contribution of the Coccolithophores group (NanoSWS) to the total abundance (Fig. 44 and 46). Five PFGs contributed more than 10% to the LCBD: PicoLowFLR (25%), NanoHighFLR (17%), PicoVeryLowFLR (17%), NanoVeryHighFLR (13%) and NanoLowFLR (10%) and followed a spatial segregation between English coasts and the Rhine-Scheldt-Meuse-Seine ROFIs, the French EEC “Coastal flow” and the Wadden Sea (waters dominated by NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR), separated by a few “buffer” areas formed by Normandy, French coast of the North Sea and Belgian Coastal Zone.

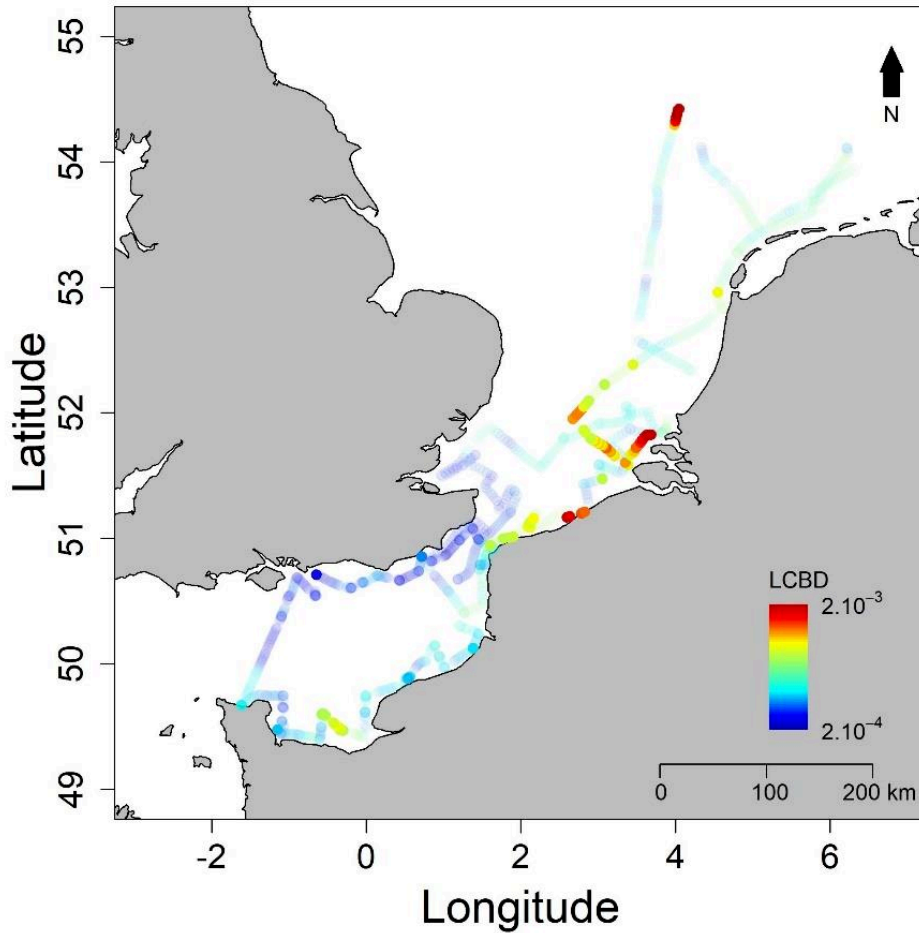


Figure 46 : Map of the LCBD index values calculated on the abundance of the phytoplankton functional groups defined by PSFCM. Transparent dots correspond to non-significant LCBD values. Filled dots correspond to significant LCBD values.

### 3.2.LCBD and water masses

Eight water masses were characterized according to the four variables recorded at high frequency (temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry, table 9). According to their geolocation, water masses were mapped on the figure 47A. Water mass 1 was mainly observed along EEC English and part of French coasts, and SNS with no direct freshwater inputs, but also in some offshore sites the Scheldt-Rhine-Meuse ROFI and Wadden Sea. Water mass 2 was defined in the EEC and SNS under limited freshwater inputs and in the Thames ROFI. Water mass 4 was represented by some French (Bay of Seine, Normandy and Southern

to the Bay of Somme), Belgian (Belgian Coastal Zone, southern to the Scheldt mouth) and Dutch coastal sites under freshwater inputs between the North Sea and the Wadden Sea. Water masses 3 and 7 represented, respectively, the offshore waters of the EEC (WM3) and of the SNS (WM7) and water mass 5 corresponded to the offshore waters of the SNS. Finally, water masses 6 and 8 represented waters by the Scheldt-Rhine-Meuse estuaries and the Wadden Sea, the water mass 8 being the most brackish water mass (mean temperature was higher and mean salinity was lower than any other WMs).

Tableau 9 : Mean  $\pm$  sd of the environmental variables (temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry) among the eight regions.

Region	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Salinity	Distance to the shore (km)	Bathymetry (m)
1	10.96 $\pm$ 0.34	34.33 $\pm$ 0.37	18 $\pm$ 10	-30 $\pm$ 6
2	11.24 $\pm$ 0.32	34.39 $\pm$ 0.27	7 $\pm$ 6	-15 $\pm$ 5
3	10.92 $\pm$ 0.23	34.42 $\pm$ 0.36	19 $\pm$ 11	-53 $\pm$ 9
4	11.65 $\pm$ 0.27	33.09 $\pm$ 0.47	9 $\pm$ 6	-17 $\pm$ 7
5	11.47 $\pm$ 0.53	34.92 $\pm$ 0.33	62 $\pm$ 13	-31 $\pm$ 5
6	12.82 $\pm$ 0.44	33.41 $\pm$ 0.66	21 $\pm$ 13	-21 $\pm$ 6
7	10.24 $\pm$ 0.27	34.49 $\pm$ 0.05	110 $\pm$ 16	-43 $\pm$ 4
8	14.31 $\pm$ 0.57	31.45 $\pm$ 0.68	8 $\pm$ 6	-13 $\pm$ 6

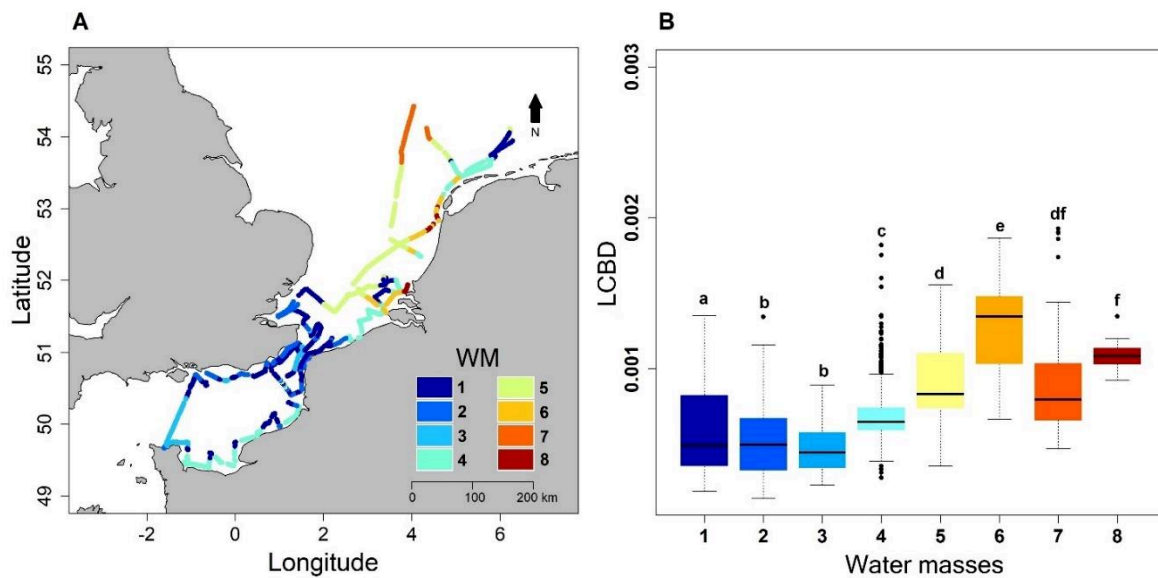


Figure 47 : A. Water masses discriminated from temperature, salinity, distance to the shore and bathymetry; B. Boxplot of the LCBD values in each water mass and their relations after Mann-Whitney and Tukey-HSD post hoc tests ( $p < 0.05$ ).

Water masses were also characterized by their LCBD values which made it possible to detect the extent of community changes across water masses. The Mann Whitney test and Tuckey-HSD post hoc detected significant difference ( $p < 0.05$ ) in LCBD in the community composition between the different water masses (Fig. 47B). At smaller scale, lowest values of LCBD were found in the water masses 1, 2 and 3 and they were slightly lower than in the water mass 4 (Fig. 47B). In the Southern North Sea, the values of LCBD were significantly different between water masses 5, 6 and 8. Water mass 7 was not significantly different from water mass 5 and water mass 8 but was with water mass 6 which showed the highest LCBD values of all.

The calculation of the SCBD amongst water masses gave the contribution of each PFG to the beta diversity within each water mass. PFGs contributed unequally to the SCBD (Fig. 48). *Synechococcus*-like showed the highest contribution to beta diversity in water mass 8 and the lowest in water masses 5 and 7. Cryptophytes and, to a lesser extent, PicoHighFLR, showed low contribution to the SCBD in most water masses. NanoLowFLR contributed the most to SCBD in water masses 5 and 6. NanoVeryHighFLR showed its highest contribution to beta diversity in water masses 5, 6 and 8 whereas it was co-dominant with PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR and NanoHighFLR group in the water masses 1, 2, 3 and 4. In water mass 7, there was a high contribution to beta diversity for the Coccolithophores. Cryptophytes, *Pseudo-nitzschia*. Microphytoplankton only contributed up to 6.99% to the beta diversity.

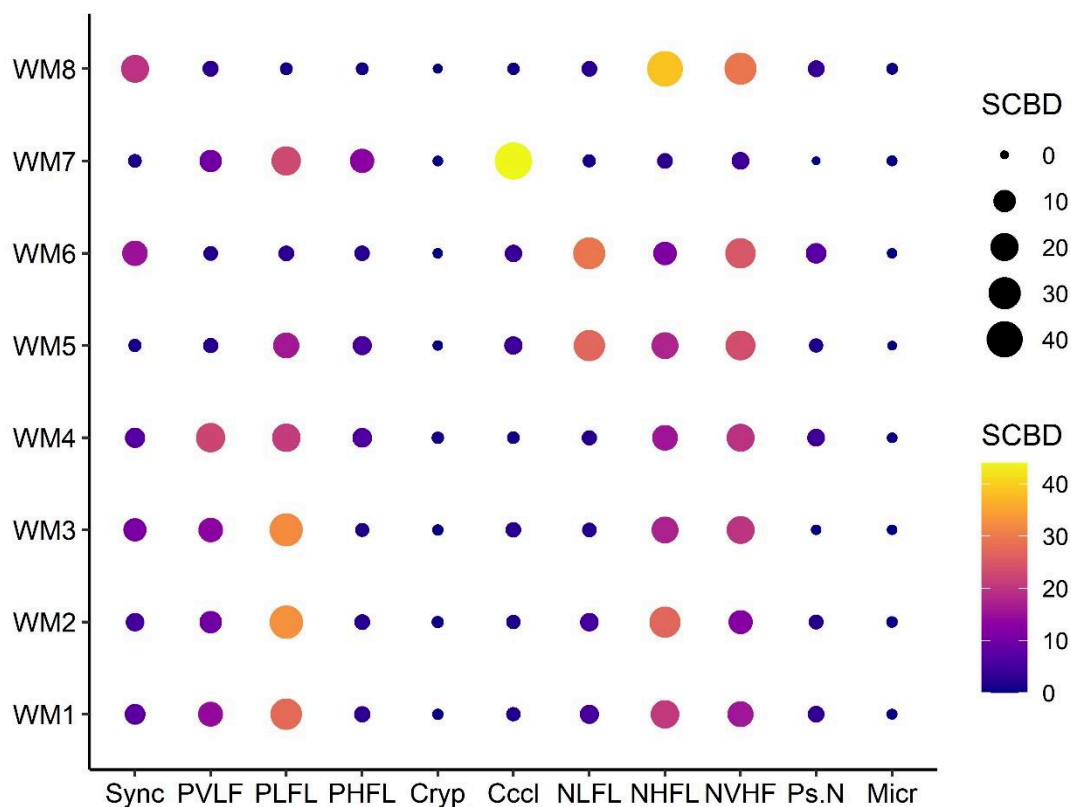


Figure 48 : Species Contribution to Beta Diversity (SCBD) of each phytoplankton functional groups among the eight water masses. SCBD is expressed in percent. The eleven PFGs are *Synechococcus* (Sync), PicoVeryLowFLR (PVLf), PicoLowFLR (PLfL), PicoHighFLR (PHfL), Cryptophytes (Cryp), Coccolithophores (Cccl), NanoLowFLR (NLfL), NanohighFLR (NHfL), NanoVeryHighFLR (NVHF), *Pseudo-nitzschia* (Ps.N), Microphytoplankton (Micr)

### 3.3.Niche analysis

The global test of the average marginality of the PFGs obtained by the OMI analysis was significant, thus indicating the influence of the environment on phytoplankton community structure (Monte Carlo test,  $p < 0.001$ ). All the PFGs showed a significant deviation of their niche with respect to the origin of the available parameters (Table 10). The 2 first axes of the OMI analysis represented 95 % of the total variance with 55.2 % of the total inertia explained by the first axis and 39.2 % by the second axis (Fig. 49). Axis 1 was explained by spatial gradients (offshore-inshore, East-West, North-South) whereas axis 2 was explained by the environmental parameters considered.

Tableau 10 : Niche parameters of the phytoplankton functional groups characterized in this survey.

PFG	Inertia	OMI	Tolerance	Residual tolerance (%)	p-value
<i>Synechococcus</i> -like	3.50	0.08	0.43	85.5	0.001
PicoVeryLowFLR	3.21	0.17	1.35	52.6	0.001
PicoLowFLR	3.53	0.11	0.87	72.0	0.001
PicoHighFLR	6.21	0.30	1.62	69.0	0.001
Cryptophytes	3.62	0.07	1.09	68.0	0.001
Coccolithophores	6.03	0.28	3.33	40.1	0.001
NanoLowFLR	4.81	0.18	1.25	70.3	0.001
NanoHighFLR	4.05	0.02	1.43	64.2	0.001
NanoVeryHighFLR	3.65	0.03	1.83	49.1	0.001
<i>Pseudo-nitzschia</i>	5.37	0.92	2.93	28.2	0.001
Microphytoplankton	4.00	0.16	2.07	44.3	0.001

NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR exhibited the lowest marginality (OMI: NanoHighFLR: 0.02, NanoVeryHighFLR: 0.03) with intermediate values of niche breadth (Tol: NanoHighFLR: 1.43, NanoVeryHighFLR: 1.83). Intermediate values of marginality were calculated for *Synechococcus*-like (OMI: 0.08), PicoVeryLowFLR (OMI: 0.17), PicoLowFLR (OMI: 0.11), Cryptophytes (OMI: 0.07), NanoLowFLR (OMI: 0.18) and Microphytoplankton (OMI: 0.16). Among these PFGs, *Synechococcus*-like, PicoLowFLR and Cryptophytes exhibited a wide niche breadth (Tol: *Synechococcus*-like: 0.43, PicoLowFLR: 0.87, Cryptophytes: 1.09). Despite microphytoplankton are probably the most diverse of all PFGs, they exhibited a very narrow niche breadth (Tol: 2.07). PicoVeryLowFLR and NanoLowFLR showed intermediate niche breadth (Tol: PicoVeryLowFLR: 1.35 and NanoLowFLR: 1.25). Finally, a high marginality was calculated for PicoHighFLR (OMI: 0.30), Coccolithophores (OMI: 0.28) and *Pseudo-nitzschia* (OMI: 0.92). PicoHighFLR and *Pseudo-nitzschia* exhibited intermediate niche breadth (Tol: PicoHighFLR: 2.01 and *Pseudo-nitzschia*: 2.44) whereas Coccolithophores exhibited the narrowest niche breadth (Tol: 3.33). *Pseudo-nitzschia* as well as Microphytoplankton were more likely observed, respectively, in warm and offshore waters (deeper stations), Coccolithophores were more abundant in the saltier waters and NanoLowFLR

and PicoHighFLR have affinity for offshore waters. The other PFGs showed less restrictions regarding the environmental variables measured in the study area.

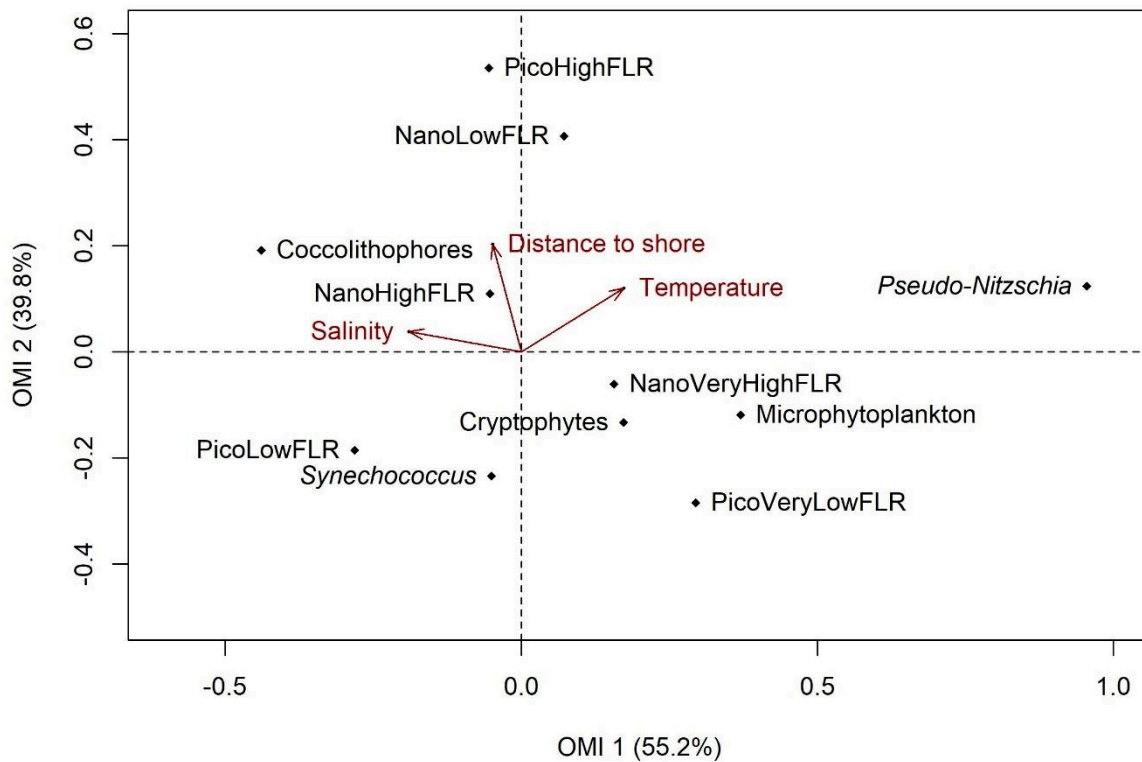


Figure 49 : Outlying Mean Index (OMI) analysis of the eleven phytoplankton functional groups (PFG) characterized by the automated pulse shape-recording flow cytometry according to the four continuously-recorded environmental parameters. Bathymetry was removed from the plot because it was not significantly involved in the analysis.

In addition to the ordination method, the Kernel Density Estimation plots (Fig. 50) revealed the 1-dimension responses of the eleven PFGs in relation to nutrient ratios (i.e. N:P, Si:N and Si:P) from discrete stations (annexes IV, V and VI), over the whole study period (April 21 to May 18). From this, we found that six PFGs (*Synechococcus*, PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR, NanoLowFLR, Cryptophytes and Microphytoplankton) showed a preference for high N:P ratio (peaks at N:P = 31). NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR high abundance was preferentially



observed in areas with slightly lower N:P ratios (N:P = 16). Coccolithophores were abundant in water masses characterized by low N:P ratio (maximal KDE for N:P = 2.5) whereas *Pseudo-nitzschia* were more likely observed in water masses characterized by high N:P ratio (maximal KDE for N:P = 126). From the eleven PFGs considered in the present study, seven were very abundant (PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, NanoVeryHighFLR, Cryptophytes, *Pseudo-nitzschia* and Microphytoplankton) in water masses characterized by Si:P ratio comprised between 10 and 100. The Si:P ratio of the water masses where *Synechococcus*, PicoVeryLowFLR and PicoLowFLR occurred strongly, ranged between the limit of detection of the nutrients (Si and P) and 50. Consequently, their distribution is not affected by the nutrients' concentrations of the study area, at this period of the year. The Coccolithophore group was more abundant in waters characterized by a ratio Si:P between 3 and 31 with a mean around the Redfield ratio (Si:P = 16). Concerning the Si:N ratio, all picophytoplankton groups (i.e. *Synechococcus*, PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR and PicoHighFLR) were mainly observed in water masses characterized by Si:N ratios below the Redfield ratio (i.e. Si:N = 1). However, the density of PicoVeryLowFLR showed a second mode, the second one being higher than the Redfield ratio. Cryptophytes were most abundant in water masses characterized by low (<1) Si:N ratios. NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR exhibited the same KDE plots. They were mainly abundant in water masses where the Si:N ratio ranged between 0.1 and 10 but preferentially in water masses with a Si:N ratio near the Redfield ratio. The Coccolithophores group was mainly observed in water masses with a Si:N ratio above the Redfield ratio whereas the opposite pattern was observed for *Pseudo-nitzschia*. Finally, Microphytoplankton group was most abundant in water masses with Si:N ratio below or equal to the Redfield Ratio but was widely distributed across the nutrient-ratio range.

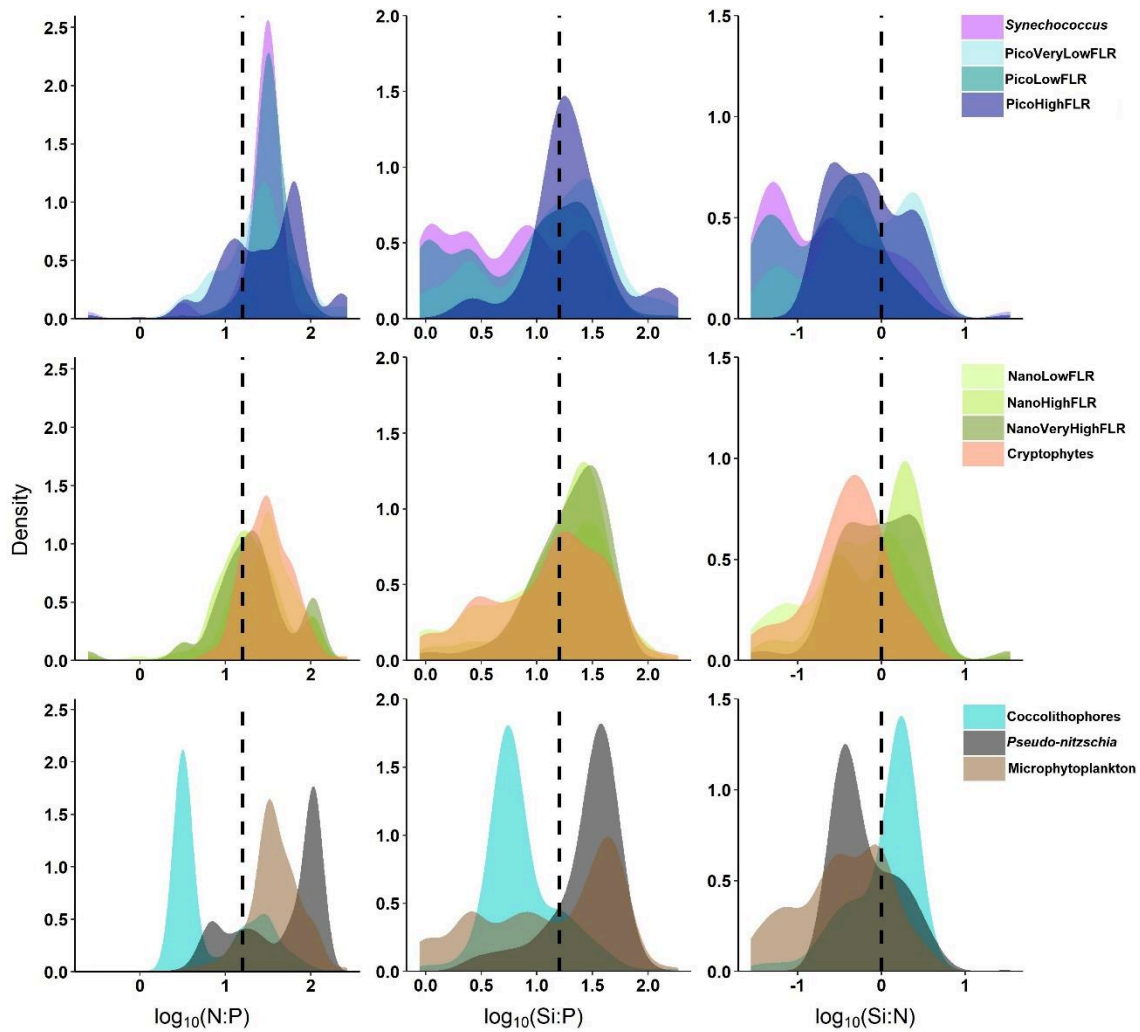


Figure 50 : Kernel Density Estimation plots showing the frequency of abundance of each Phytoplankton Functional Group related to nutrient ratios. The dashed lines represent the logarithm of the Redfield ratios (i.e. N:P = 16; Si:P = 16; Si:N = 1).

### 3.4.Overlap of the niches

The Schoener Index matrix reveals the overlap between pairs of phytoplankton functional groups (Fig. 51). The niche overlap (NO) was comprised between 0.35 (*Pseudo-nitzschia* and PicoLowFLR) and 0.74 (*Synechococcus*-like and PicoLowFLR). We set arbitrary high NO for values below 0.45, intermediate NO for values of NO comprised between 0.45 and 0.60, high NO for values above 0.60. High NO was found between three picophytoplankton groups: *Synechococcus*-like, PicoVeryLowFLR and PicoLowFLR. The same trends were found

between NanoLowFLR and NanoHighFLR and between NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR. In addition, Coccolithophores exhibited high NO with *Synechococcus*-like and PicoLowFLR. Microphytoplankton showed high NO with all the phytoplankton groups except with PicoHighFLR (low NO), NanoVeryHighFLR and *Pseudo-nitzschia* (intermediate NO). *Pseudo-nitzschia* had low NO with the picophytoplankton (*Synechococcus*-like, PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR, PicoHighFLR), the Cryptophytes and the Coccolithophores. PicoHighFLR exhibited low NO with the three other picophytoplankton groups: *Synechococcus*-like, PicoVeryLowFLR and PicoLowFLR

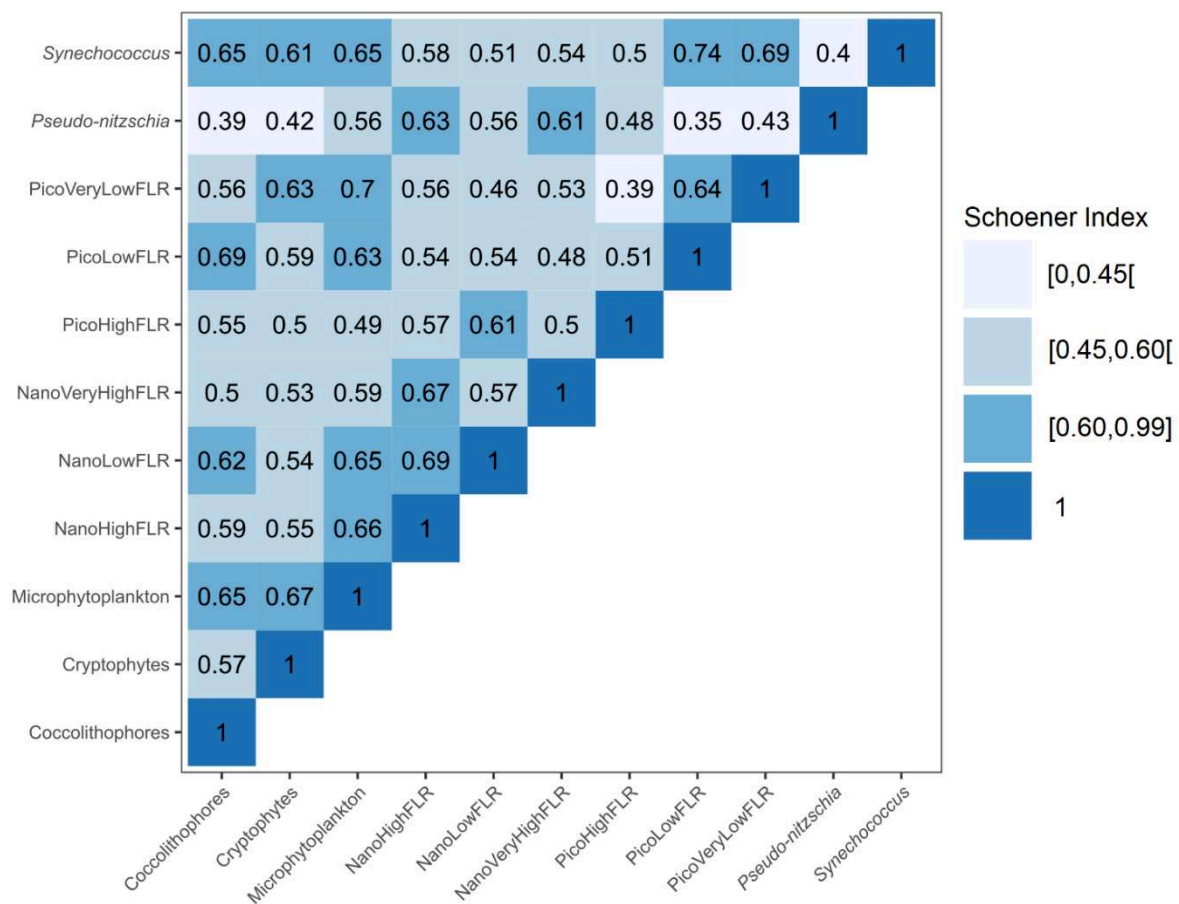


Figure 51 : Upper Correlation matrix representing pairwise overlap between the different phytoplankton functional groups defined by automated pulse shape-recording flow cytometry. Blue gradient, from light blue to dark blue shows the increase in niche overlap. Below 0.45, the Schoener index is low; from 0.45 to 0.59, values are intermediate and above 0.60, values of the Schoener index are high.

### 3.5. Relation between niche and spatial analysis

Based on the high frequency data from the flow cytometer and the environmental variables considered, the Beta-regression model of the abundance function of the environment, showed that environmental variables explained 37 % of the variation in the LCBD (table 11). Temperature and the distance to the shore explained positively and significantly ( $p < 0.001$ ) the values of LCBD. Intercept and salinity were negatively and significantly ( $p < 0.001$ ) related to the LCBD values. Bathymetry was not significant.

The second model explained significantly the niche position ( $p < 0.001$ ) and the niche breadth ( $p < 0.01$ ) of PFGs to be good estimators of the SCBD amongst the different water masses. The model explained 23 % of the variation in the SCBD (table 11).

Tableau 11 : Beta regression analysis of two responses variables: Local Contribution to Beta Diversity (LCBD) and Species Contribution to Beta Diversity (SCBD). The LCBD was explained by the continuous environmental data. The SCBD was explained by the PFG niche features (niche position and niche breadth). SE: Standard Error; df: degree of freedom; z: z-statistic (estimate divided by SE) and p: probability value.

	Estimate	SE	df	z	p	Pseudo-R <sup>2</sup>
(a) LCBD						
Intercept	-5.66	0.56	6	-10.15	<b>0.001</b>	
Temperature	0.22	0.01	6	15.02	<b>0.001</b>	
Salinity	-0.13	0.01	6	-9.39	<b>0.001</b>	
Distance to shore	0.01	$4 \times 10^{-4}$	6	19.44	<b>0.001</b>	
Bathymetry	$-1 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-4}$	6	-0.15	0.89	0.37
(b) SCBD						
Intercept	-2.18	0.17	4	-13.10	<b>0.001</b>	
Niche position	3.85	0.65	4	5.93	<b>0.001</b>	
Niche breadth	-1.08	0.35	4	-3.06	<b>0.01</b>	0.23

## 4. Discussion

### 4.1. High frequency/Spatiotemporal distribution

The use of high frequency PSFCM for continuous analysis of phytoplankton communities highlighted high spatiotemporal heterogeneity. Changes in the assemblage's composition were observed at sub-mesoscale (1 - 10 km) over less than one month of sampling following the

development of a phytoplankton spring bloom. The heterogeneity in the PFG distribution was first determined by the abundance of each PFG and by total absolute abundance. It was also characterized by changes in the contribution of each PFG to the total abundance. Indeed, during the three cruises, total abundance sometimes decreased or increased of two orders of magnitude within few kilometers. Moreover, the combination of spatial overlap and time lag between the cruises also highlighted temporal changes of the abundance in the assemblage's composition from one week to another. In the study area, spatiotemporal dominance of phytoplankton groups was consistent with Bonato et al. (2015) in which, in spring, nanophytoplankton, especially NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR, dominated the abundance along the French coasts of the EEC, whereas picoeukaryotes and *Synechococcus* dominated the abundance along the western coasts of the EEC.

None of the previous studies in the area focused on phytoplankton distribution during the development of spring blooms through EEC and SNS, including different systems more or less influenced by important estuarine inputs, from the Bay of Seine and the Thames to the Scheldt-Rhine-Meuse estuaries and the Wadden Sea. Within local, national (Monitoring Waterstaatkundige Toestand des Lands, Rijkswaterstaat, CPER MARCO) and European projects (DYMAPHY, <http://www.dymaphy.eu>; LifeWatch project, <http://www.lifewatch.be> and JERICO-NEXT; <https://www.jerico-ri.eu>), recent integrative surveys have investigated spatial and temporal distribution of phytoplankton in part of our study area (Aardema et al., 2019; Bonato et al., 2015; Thyssen et al., 2015). In the EEC and SNS, phytoplankton blooms starts in late winter/early spring with a diatom bloom followed by or concomitant bloom of the Haptophyte *Phaeocystis globosa*, the latter alternating between a colonial stage (*i.e.* diploid free cells or colonial cells) in the mid phase and solitary cells (*i.e.* haploid free cells) at the initiation and the senescence of the bloom (Grattepanche et al., 2011; Guiselin, 2010; Lamy et al., 2009; Lefebvre et al., 2011; Peperzak, 1993; Rousseau et al., 2007; Seuront et al., 2006; Stelfox-

Widdicombe et al., 2004). Such observations of these spatiotemporal successions of blooms were reported along the French, Belgian and Dutch coasts using microscopy (Breton et al., 2006; Gómez and Souissi, 2007; Grattepanche et al., 2011; Schoemann et al., 2005), HPLC-CHEMTAX method (Muylaert et al., 2006; Schlüter et al., 2000), multispectral fluorometry (Houliez et al., 2012b), flow cytometry (Aardema et al., 2019; Bonato et al., 2016, 2015; Rutten et al., 2005; Thyssen et al., 2015) and molecular approaches (Christaki et al., 2014; Genitsaris et al., 2016, 2015; Monchy et al., 2012; Rachik et al., 2018). Previous studies in the EEC and SNS reported the presence of three groups of *P. globosa* observed by automated flow cytometry (Bonato et al., 2015; Guiselin, 2010; Rutten et al., 2005). They are differentiated each other by their amount of chlorophyll *a* (*i.e.* by the expression of the chlorophyll *a* autofluorescence-FLR) and their size. As *P. globosa* represents the quasi-exclusive species within the nanophytoplankton groups (Brussaard et al., 1996), we tested the relation between NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR sorted by the PSFCM and *Phaeocystis globosa* counts by microscopy by a Spearman rank correlation and we obtained a strong and significant correlation ( $\rho = 0.75$ ,  $p < 0.001$ ). Therefore, we labelled NanoLowFLR, NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR as different life-stages of *P. globosa* (Guiselin, 2010; Peperzak, 1993; Rutten et al., 2005). NanoLowFLR and NanoHighFLR are stated to be haploid free cells of *P. globosa* and NanoVeryHighFLR is stated to be diploid free cells of *P. globosa* (Bonato et al., 2016, 2015). We also characterized a group composed of symmetric and narrow cells and two symmetric chloroplasts. According to the images obtained by the camera mounted on the flow cytometer (see description in Pereira et al., 2018), we could label the group as *Pseudo-nitzschia* spp. Nevertheless, in our study, low but significant Spearman rank correlation was found for this group between the PSFCM and the microscopic counts ( $\rho = 0.39$ ,  $p < 0.001$ ). As the detection of a particle can as well correspond to a single-cell or a colony, the latter case can reveal a bias due to an under-estimation of the number of cells during colonial stage,

considering that also *Pseudo-nitzschia* usually colonizes *Phaeocystis globosa* colonies at the last phase of the spring bloom (Sazhin et al., 2007).

In this survey, we also report a short-term spatiotemporal phenology of *P. globosa* bloom by characterizing its dominant life-stages among the spatial overlapped areas. The first spatial overlap occurred between PHYCO cruise (20 to 21 of April) and the VLIZ cruise (8 to 9 of May, VLIZ cruise). Over the fifteen days between the two investigations off three French estuaries (Somme, Authie and Canche) and the Strait of Dover (continuum of brackish water influence called in the French EEC as “coastal flow”, Brylinski, 1991), the abundance of the haploid and very fluorescent morphotype of *P. globosa* increased. Such observation might have represented the expansion phase of the bloom in which haploid highly fluorescent morphotype evolves to the diploid morphotype by sexual processes (Rousseau et al., 2007). In addition, at the end of the PHYCO cruise, the diploid life-stage of *P. globosa* (NanoVeryHighFLR) was very abundant in the French coastal waters of the “Coastal flow”. This observation suggests the peak of the *P. globosa* bloom to occur in this area at the end of April. A second spatial overlap occurred also during the VLIZ and RWS cruises in the Scheldt-Rhine-Meuse ROFI. During the first recording time in this area (end of VLIZ cruise, 12 of May), the haploid and high fluorescent morphotype dominated the total NanoFLR abundance whereas six days later (end of RWS cruise, 18 of May), the second recording in the ROFI area was marked by a dominance of the haploid and low fluorescent morphotype. This latter observation in combination with the absence of the diploid morphotype relate the senescence of *P. globosa* bloom in the mid of May 2017 (Rousseau et al., 2007).

Spatiotemporal changes in the assemblage composition (in term of PFGs) was highlighted, first by investigating the raw abundance of each group and then, by calculating the LCBD which is a powerful analysis for high resolution datasets and which revealed changes due to the subsidiary PFGs, according to their relative abundance. Here, the LCBD was processed for each

site and showed it is particularly suitable for high frequency biological monitoring. Indeed, the LCBD confirmed the spatiotemporal heterogeneity observed on the abundance and highlighted also significant changes in the community composition. In the EEC and SNS, the distance to the shore (Baretta-Bekker et al., 2009) and the salinity (Desmit et al., 2015) are important structuring features of the area. Both are correlated with nutrients because high nutrients concentration are brought by a variety of freshwater inputs due to river as well as land disperse runoff (Ruddick and Lacroix, 2006) compared to low but constant inputs of the Atlantic Ocean, especially in English Channel and Southern North Sea offshore waters through the Strait of Dover. The number of estuaries combined to the bottleneck effect of the Dover Strait contributed to drive brackish waters through the north and along the coast, being well separated from offshore mid-Channel Atlantic waters by a tidal front (“Coastal flow” in the EEC; Brylinski and Lagadeuc, 1990); and on the other hand, brackish waters driven by the Scheld-Rhine-Meuse estuaries forming the “Coastal river” in the SNS (Baretta-Bekker et al., 2009). In the present study, salinity was never related significantly to nutrients concentrations (only assessed in discrete stations), whereas the distance to the shore was negatively and significantly related to nutrients ( $\rho_{\text{NO}_3} = -0.40$ ;  $\rho_{\text{NO}_2} = -0.37$ ;  $\rho_{\text{SiO}_2} = -0.33$ ;  $\rho_{\text{PO}_4} = -0.34$ ; all significant at  $p < 0.05$ ). Consequently, the fact that NanoFLR and microphytoplankton groups contributed less as the distance to the coast increased in areas under freshwater influence was consistent with the theory of enrichment (Riebesell, 1974). On the contrary, the distribution of Coccolithophores abundance increased with the distance to the coast in the SNS, forming high abundance patches in Central North Sea waters close to the Dogger Bank, as described previously by Charalampopoulou et al. (2011).

Although the local environmental and spatial variables significantly explained sites contribution to  $\beta$ -diversity, the variables did not strongly explain the model ( $R^2 \text{ adj.}_{\text{LCBD}} = 37\%$ ). This observation corroborates other findings, suggesting that LCBD was



variably related to environmental factors (Heino and Grönroos, 2017; Tonkin et al., 2016). Nevertheless, in these studies, the variables were known as structuring PFGs, while in phytoplankton studies, salinity and the distance to the coast are not known to be main structuring variables, whereas temperature is known to regulate only some species, such as *P. globosa*, in our case (Verity et al., 1988). Despite salinity and nutrients are highly correlated (Desmit et al., 2015), adding the nutrients at high frequency would have increased the relevance of the model. However, the principal limit in the eastern English Channel and southern North Sea concerns a lack of availability of high spatial resolution monitoring of nutrients. Increasing the number of environmental parameters recorded at high frequency would be a major improvement (Hydes et al., 2010; Pellerin et al., 2016; Vuillemin et al., 2009). Nevertheless, adding structuring variables is not a proof of giving better explanation of the results especially because our cruises corresponded only to a small snapshot of a period of the year and did not integrate the history of environmental data for the present situation of phytoplankton assemblages.

#### 4.2. Niche distribution and overlap

Such as stated by several authors (Cullen et al., 1997; Glibert, 2016; Ramon Margalef, 1978; Reynolds, 2006), spatiotemporal heterogeneity of the Phytoplankton Functional Types (PFT) abundance, highlights the concept of life-form adaptation to pelagic habitats (*i.e.* spatial niche). In flow cytometry studies, it is more adequate to define the groups as Phytoplankton Functional Groups (PFGs) according to Reynolds definition (1997) and this, for two reasons: first, the PFG definition is more generalistic than the PFT definition because flow cytometry is not able to characterize the biogeochemical features of the groups (it is based on optical properties related mainly to morphology, size and pigment composition). Then, it has already been shown that the traits at the level of the PFG used in flow cytometry are to some extent reliable to detect

different ecological strategies (Breton et al., 2017; Litchman et al., 2007; Litchman and Klausmeier, 2008).

Our study showed differences in the niche position and niche tolerance between the phytoplankton groups having consequences on the niche overlap between PFGs. These differences were due to temperature, salinity, distance to shore and bathymetry showing a trade-off in the space use, related to the environmental parameters. Consequently, the spatiotemporal distribution of the PFGs results in a trade-off in the use of the resources (Breton et al., 2017). However, all the PFGs defined in the present study showed a high residual tolerance, arguing that a high proportion of the spatiotemporal variability is not only explained by our environmental variables. Indeed, as mentioned in the previous part, other factors should have been considered such as physico-chemical (e.g. nutrients), physical (e.g. turbulence, current, wind stress) or physiological/biological factors (e.g. photosynthetic parameters, competition, predation). For example, other temperate coastal studies focusing on low frequency discrete long-term sampling series (Heino and Soininen, 2006; Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018) addressed phytoplankton connection with nutrients, which are known to be important parameters of phytoplankton temporal distribution. In those studies, residual tolerances were variable and sometimes particularly high (15% to 94% in Heino and Soininen, 2006; 55% to 87% in Hernández Fariñas et al., 2015; 46% to 84% in Karasiewicz et al., 2018). The residual tolerances calculated in our study were in the same range (28% to 86%). Consequently, adding structuring variables might not have provided better explanation of the niche parameters. However, the results of the permutation tests were significant and demonstrate that the variables used in our study significantly explained the distribution of the PFGs during the month considered in the area considered. Although some structuring variables were missing in HF analyses, the main aim of our study was to investigate the high spatiotemporal resolution of the PFGs configuration during the spring bloom development,

according to hydrological features influencing their distribution. Some physico-chemical variables measured on discrete stations were then considered for niche repartition and overlap over 1-dimension.

In the present study, the environmental and spatial variables explained between 12.4% and 55.2% of the inertia of the PFGs. As we characterized spatiotemporal niches of our PFGs, we prefer to state PFGs being either “ubiquitous” or “autochthonous” instead of being respectively called “generalists” or “specialists” as it is usually defined in niche studies considering species or genera. In the biogeography field, the expression “autochthonous” is used to qualify for native organisms. In our study, we use the expression “autochthonous” for the PFGs which are spatially restraint. PFGs can be restraint due to interactions with other PFGs, by being low competitors, by selective predation or parasitism, but also, they can be restraint by the resources which can be non-optimal for their development. Here, Cryptophytes and two life stages of *P. globosa* (NanoHighFLR and NanoVeryHighFLR) exhibited the lowest marginality meaning their spatial niche was wide during the period considered, thus exhibiting a large spatial distribution and being “ubiquitous” PFGs, the former at relatively high abundance compared to the latter. On the contrary, PFGs exhibiting high marginality such as PicoHighFLR, Coccolithophores and *Pseudo-Nitzschia* occurred in less common habitats in mid spring which means, here, that their spatial distribution is confined to some specific areas, defining these PFGs as “autochthonous”. In addition, “ubiquitous” PFGs were also observed to be more tolerant to environment changes than the “autochthonous” PFGs which were more restraint by the environment defined in this study. Moreover, as the *P. globosa* bloom was dominated by up to 80% of this species (Breton et al., 2000), the last 20% remained for the other groups which made them more constraint by the environmental conditions. Indeed, considering the “silicate-*Phaeocystis* hypothesis” (Lancelot et al., 1987; Reid et al., 1990) and the phosphorus depletion hypothesis (Egge, 1998) in diatoms growth, the silicate and phosphorus depletions after or

during the decaying phase of the diatom bloom allowed *P. globosa* to bloom and reduce the habitat of the diatom (Litchman and Klausmeier, 2008) hence reducing the silicate and phosphorus niches for the diatom (forming part of the microphytoplankton group) as well as *Pseudo-nitzschia* group. In our study, the presence of *Pseudo-nitzschia* spp. was strongly associated with water masses characterized by high N:P (fig. 50) and *P. globosa* was more associated with water masses characterized by a ratio of N:P around 1 and higher. These results reveals that *Pseudo-nitzschia* spp. and *P. globosa* development are stimulated by nitrogen inputs (Cadée and Hegeman, 1991; Carter et al., 2005; Claquin et al., 2010; Downes-Tettmar et al., 2013; Liefer et al., 2009; Parsons et al., 2013; Riegman et al., 1990; Thorel et al., 2017), whereas the rest of the microphytoplankton (called here “Microphytoplankton”, mainly composed by diatoms and few pigmented dinoflagellates) are observed in water masses with low N:P because microphytoplankton growth requires high concentration of silicates and/or phosphorus (Thorel et al., 2017). Here, microphytoplankton showed affinity for high Si:P and low Si:N. These results clearly explained an imbalance between the nutrients. The low Si:N states a silicate depletion and a high Si:P results of a strong depletion of phosphorus. Consequently, the dominance, in terms of abundance, of *P. globosa* over microphytoplankton would refer to silicate depletion and/or phosphate depletion hypotheses. On the contrary, cryptophytes which are observed to be ubiquitous with a wide niche breadth are known to be a stress-tolerant group (Ramon Margalef, 1978) occurring after disturbance. Such *in situ* observations were also congruent with temporal monitoring, pointing out their presence in April-May in this area (Bonato et al., 2015; Schapira et al., 2008). The abundance of coccolithophores is reported to be low along the coast with a fast increase of five orders of magnitude in few kilometers in Central North Sea waters getting closer to the Dogger Bank. This area regularly suffers of the lack of study of the marginal groups of phytoplankton. Indeed, only few observations were previously reported, mainly in summer (Charalampopoulou et al.,

2011; Holligan et al., 1993). Holligan et al., (1993) observed that the coccolithophore *Emiliana huxleyi* bloomed just after the diatoms when inorganic nutrients were depleted. Consequently, after the diatom bloom, *P. globosa* dominates rich nutrient water masses along the coast and restraint coccolithophore to offshore evidencing this group as being “autochthonous”, with low environmental tolerance (*i.e.* small niche breadth) in the Southern North Sea.

Picoeukaryotes can be segregated into two parts according to their niche parameters. On one side, PicoHighFLR followed the same pattern as the coccolithophores. *Synechococcus*, PicoVeryLowFLR and PicoLowFLR groups showed the same spatiotemporal niche being ubiquitous and having a large tolerance to the set of environmental parameters considered in our analysis. Consequently, they were able to share the same niche (Chen et al., 2011). Finally, a last picoeukaryote group labelled as PicoHighFLR was more marginal than the three previous groups with high tolerance to the environment. Its abundance increased together with the distance to the coast. Consequently, this PFG was considered as “autochthonous” of offshore waters and the high environmental tolerance mean that it was observed in large gradient of environmental conditions. Picoeukaryotes groups might be inferred to *Picomonas* spp. and Picobiliphyta, two groups regularly detected by molecular analysis in the Eastern English Channel during the spring blooms (Christaki et al., 2014; Genitsaris et al., 2015; Rachik et al., 2018). Other autotroph nanoeukaryotes co-occurring with *P. globosa* are commonly evidenced in the Belgian and Dutch coast such as Chrysomonadales and Euglenophyceae (Prins et al., 2012).

A large degree of spatial overlap was also quantified. The *Synechococcus*, PicoVeryLowFLR and PicoLowFLR groups exhibited large values of overlap showing these three groups capable of co-occurring in space and time thus showing similar dynamics. These three groups exhibited the lowest niche overlap with the three life-stages of *P. globosa*. The coastal ecosystem classification (Cebrián and Valiela, 1999) may explain the spatial segregation. According to

Bonato et al., (2015), the French EEC coast is characterized as an Enclosed Coastal Ecosystem (ECE) dominated successively from late winter to late spring by microphytoplankton (mainly diatoms) and by nanophytoplankton especially *P. globosa*. In the opposite, the offshore waters and the southern English coastal waters (i.e. English Channel part) are characterized as Open Coastal Ecosystem (OCE) and are dominated by picophytoplankton. Because the water masses of the English Channel are drifting towards the North, the ECE defines a connection of brackish waters from the Bay of Seine to the Wadden Sea (Desmit et al., 2015), interrupted by some temporal and spatial discontinuities (as in the Haute Normandie coasts and southern part of the Belgian Coastal Zone). Low overlap values between Microphytoplankton and *Pseudo-nitzschia* groups versus *P. globosa* life-stages are supported by the phenology of the blooms. Indeed, in spring, the timing and the amplitude of the blooms are strongly dependent of the nutrient stock and the light availability. This result is also supported by the high abundance of the different life-stages of *P. globosa* along the coast (Lancelot et al., 1987). The relatively higher niche overlap between *P. globosa* and *Pseudo-nitzschia* spp. reveals a spatiotemporal co-occurrence of the two groups. Some differences highlighted by the N:P and Si:N ratios showed that niches of single-cell stages of *P. globosa* and *Pseudo-nitzschia* spp. are different. However, the colonial stage of *P. globosa* and *Pseudo-nitzschia* spp. share the same nutrient niche revealing that *P. globosa* and *Pseudo-nitzschia* spp. co-occur in space. This observation is supported by the fact that during the transition between the single-cell to the colonial stage of *P. globosa*, *Pseudo-nitzschia* can use *P. globosa* as habitat (Sazhin et al., 2007) whereas during the senescent stage, *P. globosa* is less allelopathic which allow the growth of *Pseudo-nitzschia* spp. (Long et al., 2007).

#### 4.3. SCBD and niche

Our findings across water masses highlighted that Species Contribution to Beta Diversity (SCBD) of our phytoplankton functional groups depends on the abundance of the PFGs as well

as their niche characteristics. Indeed, a PFG that is locally abundant showing high variability across sites contributed more to the total Beta Diversity than a group that is sparsely distributed (Da Silva and Hernández, 2014; Legendre and De Cáceres, 2013; Tan et al., 2019). In addition, SCBD showed significant and positive relationship with niche position whereas this relation was negative with niche breadth. This result traduces that autochthonous PFGs with small tolerance contribute more to SCBD than ubiquitous PFGs with showed large tolerance in small areas. Both results are strongly dependent on the variation of abundance which influences the SCBD (da Silva et al., 2018). Spatially limited PFGs or high variable abundant PFGs should have high contribution to beta diversity (Heino and Grönroos, 2014). Despite significant relations evidenced between both niche characteristics and SCBD, niche breadth is weaker, in our study, than niche position in SCBD explanation. This finding is in agreement with previous studies showing that, at sub-regional scales, niche position is better than niche breadth in the contribution of the PFGs to the Beta Diversity (Heino and Grönroos, 2014). In our study, niche characteristics are limited by the range of measurement of the variables which in our case only consider the bloom period missing the extreme values of temperature and salinity occurring in winter and summer.

## **5. Conclusion and perspectives**

In conclusion, both raw abundance and LCBD index detected and explained the spatiotemporal distribution of phytoplankton functional groups defining phytoplankton communities during a spring bloom development in a highly variable coastal system, at high temporal and spatial resolution. LCBD was stronger than raw abundance in detecting the changes in the community composition based on marginal groups. These changes gave spatiotemporal segregations of the PFGs observed through niche characteristics and defined segregations between ecosystem's types (Enclosed Coastal Ecosystem vs. Open Coastal Ecosystem) as well as offshore-inshore

gradients. Consequently, niche characteristics were found to predict variation in the SCBD at this sub-regional scale.

Nevertheless, adding more structuring variables recorded at high frequency would provide more reliable niche characteristics of the PFG in the Eastern English Channel and Southern North Sea. Finally, although a coarse degree of phytoplankton characterization permitted a comprehension of the link between PFG distribution and the spatial niche characteristics, the method should also be used in local monitoring discrete stations as it has started within the MSFD by defining the ICG-COBAM (OSPAR) Pelagic Habitat Indicator number 3 (PH3; Rombouts et al., 2019). It can also be applied through several cruises and/or continuous monitoring using connecting both PSFCM and other sensors considering taxonomy, nutrients and phytoplankton physiology to study the temporal variations using existing Ferry lines through more collaborative initiative within European project (i.e. JERICO-NEXT and JERICO-S3) as well as developing regular monitoring of offshore waters to add an offshore view of the ICG COBAM PH3 across the large-spatial areas,

### **Acknowledgments**

AL was co-funded by a PhD grant from the “Université du Littoral - Côte d’Opale” and an “Hauts-de-France” Regional research fellowship. He is currently funded by a research fellowship grant of PON PLaCE ARS01\_00891 of the Stazione Zoologica Anton Dohrn. PHYCO-cruise was funded by the CPER “MARCO”, the JERICO-NEXT project and the MTES/ CNRS convention for the MSFD and Monitoring Programme implementation in Pelagic Habitats of France. VLIZ cruise was part of the LifeWatch project and it was funded as well as the RWS cruise by the JERICO-NEXT project. The JERICO-NEXT project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 654410. We thank the crew and the Captain of the research vessels



“Côtes de la Manche” (CNRS INSU), “Simon Stevin” (VLIZ) and “Zirfaea” (RWS), as well as the scientific and technical staff of the different institutes involved. We also thank the P.I. of the Belgian (Lennert Tyberghein, VLIZ) and Dutch (Arnold Veen, RWS) cruises.

### **Authors contribution**

LFA and AL conceived the study, participated to cruises and processed the flow cytometry data on the *RVs Côtes de la Manche*, *Simon Stevin* and *Zirfaea*. JM and MR were respectively in charge of the analysis onboard the *RVs Simon Stevin* and *Zirfaea*. FG carried out the microscopical taxonomic identification and counts. AL carried out statistical analyses and led the manuscript. LFA participated to the writing and, together with FGS, JM and MR commented all phase of writing and contributed to proofread the manuscript.

### **Competing interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Chapitre V : Etude de paramètres conditionnant la distribution verticale, à petite échelle, des groupes phytoplanctoniques le long d'un gradient de salinité.**

Les chapitres précédents ont mis en évidence l'intérêt de travailler à partir des traits des groupes fonctionnels phytoplanctoniques définis par la cytométrie en flux, puisque la distribution spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques pouvait être expliquée en grande partie par les paramètres environnementaux de base, et enfin, dans un troisième temps, l'importance de la contribution des différents groupes fonctionnels, associée à leur niche écologique, dans les changements de composition des communautés, tout ceci dans les dimensions horizontales.

Le présent chapitre s'intéresse aux mécanismes régissant la structuration des abondances sur les dimensions horizontale et verticale dans un environnement stratifié et présentant un gradient longitudinal de salinité : la Mer Baltique et les détroits scandinaves. Dans de ce chapitre, il est question d'étudier la réponse des groupes cytométriques à l'environnement (*sensu lato*) au travers la modélisation de leurs abondances sur les gradients horizontaux et verticaux par leurs paramètres de niches, la variation de leurs traits, les paramètres environnementaux et l'influence de l'espace pour définir la dispersion. Ce chapitre est en cours de correction et fera l'objet d'une soumission pour publication dans la revue *Estuarine, Coastal and Shelf Research*.

### Résumé

Parmi les neuf hypothèses permettant d'expliquer la distribution et les abondances des espèces, l'affinité pour les ressources, l'acquisition et l'utilisation des ressources, les traits écologiques, les paramètres environnementaux et la dynamique des métapopulations sont les principales énoncées en écologie. Les traits écologiques sont importants car ils vont permettre de séparer les niches chez le phytoplancton en contraignant ou en améliorant leur capacité dans l'acquisition et l'utilisation via la performance écologique de ces traits. Les abondances vont alors croître ou diminuer le long de gradients de ressources dépendant des valeurs des traits écologiques liés à l'acquisition des ressources. Néanmoins, l'effort pour obtenir des traits écologiques optimaux est coûteux à l'individu en terme de ressource et nécessite alors de faire des compromis entre les différents traits pour obtenir la performance écologique optimale. Par ce procédé, l'habitat des espèces (= niche) est modifié. La dynamique des métapopulations possède également un impact via la dispersion, surtout chez le phytoplancton et aux petites échelles, dans la distribution et les abondances. La plupart des études s'intéressant à ces paramètres comme mécanismes explicatifs aux abondances ont jusqu'à maintenant concerné quasi exclusivement le milieu terrestre et lorsqu'il s'agissait des écosystèmes aquatiques, elles concernaient les diatomées dulcicoles.

En Mer Baltique et dans les détroits du Kattegat et Skagerrak, les changements dans les communautés phytoplanctoniques suivent le gradient croissant est-ouest de salinité. De plus, la stratification permanente couplée aux apports continentaux en nutriments et à la topographie particulière de la zone étudiée font de la Mer Baltique une mer eutrophisée. Pour cette raison, les communautés phytoplanctoniques ainsi que les nutriments sont l'objet de réseaux de surveillance de la qualité des eaux. En été, les nutriments et la lumière sont propices au développement de blooms de cyanobactéries filamenteuses en Mer Baltique et dans le golfe de Finlande tandis que dans le Kattegat et le Skagerrak, il s'agit de blooms de dinoflagellés,

pouvant être nuisibles dans les deux cas. La stratification permanente permet également le développement le long de la colonne d'eau de ces blooms, pouvant former de larges patches monospécifiques mais également entraîner une ségrégation sur la verticale des espèces.

L'étude présentée ici se focalise sur les groupes fonctionnels phytoplanctoniques caractérisés par un cytomètre en flux automatisé, capable d'enregistrer le profil optique de chaque particule à partir de caractéristiques morphologiques, anatomiques et physiologiques. Ce type de classification permet de regrouper les différents taxons en groupes partageant des caractéristiques optiques similaires et permet de réduire la redondance fonctionnelle. En Mer Baltique, dans le Kattegat et le Skagerrak, 9 à 10 groupes ont été caractérisés dont les occurrences dépendent du positionnement dans la colonne d'eau : PicoORG, PicoLowFLR, PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, NanoLowORG, NanoHighORG, NanoSWS (groupe uniquement caractérisé lors de l'échantillonnage discret sur les stations dans le Kattegat et le Skagerrak, conformément à des études précédentes), MicroRED et MicroORG. Des études précédentes ont mis en évidence la pertinence de la caractérisation des traits (e.g. Fontana et al., 2014; Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013) et des paramètres de niches (chapitre 4 de cette thèse) pour décrire les communautés phytoplanctoniques par cytométrie en flux.

L'étude a eu aussi pour but d'étudier la distribution spatiale horizontale et verticale des groupes fonctionnels phytoplanctoniques, d'estimer leurs paramètres de niches ainsi que leurs traits dérivés de leurs propriétés optiques et ce, en Mer Baltique, détroits du Skagerrak et Kattegat. Pour ce faire, un cytomètre automatisé de type « pulse shape-recording » a été utilisé pour des mesures en continu et discrètes, présentant l'avantage de pouvoir faire des mesures *in vivo* de la totalité des particules dans le spectre de taille du phytoplancton. De plus, il a permis, directement sur le terrain, de déterminer les abondances mais également de réaliser des mesures de traits morphologiques et physiologiques à partir des signatures cytométriques dérivées des propriétés optiques des particules, permettant ainsi de définir les groupes fonctionnels

phytoplanctoniques (PFGs). L'enregistrement à haute fréquence en sub-surface a été réalisé via une acquisition toutes les 10 minutes. En parallèle, la mise en évidence de la structure verticale a été possible via l'analyse de six profondeurs à dix-huit stations. Trois objectifs ont été définis :

- 1) Etudier la distribution à fine échelle des groupes phytoplanctoniques sur trois dimensions (latitudinale, longitudinale et verticale).
- 2) Caractériser les paramètres de niche dans le gradient horizontal de salinité définissant deux larges sous-ensembles (Mer Baltique et golfe de Finlande et Kattegat et Skagerrak) et ce, à six profondeurs (au-dessus, au niveau de et en dessous de la pycnocline)
- 3) Etudier les paramètres intrinsèques aux groupes cytométriques (niches et traits) et environnementaux (dispersion et paramètres physico-chimiques) qui modélisent le mieux la distribution et les abondances des différents groupes cytométriques dans ce gradient horizontal et vertical.

Les objectifs décrits ci-dessus ont été étudiés via quatre groupes d'analyses statistiques : 1) des analyses multivariées pour observer les potentielles agrégations de stations en fonction des profondeurs (PCA), puis la définition des niches écologiques potentielles (OMI) et enfin la définition des sous-niches écologiques par sous-ensemble (WitOMI); 2) la réalisation d'Analyses Principales des Coordonnées (PCoA) par sous-ensemble et par profondeur pour les traits pour être définis de manière continue afin de garder leur variation spatiale ; 3) la carte des valeurs propres de Moran à partir de distance géographique (db-MEM) pour potentiellement détecter les autocorrélations spatiales et 4) les modèles linéaires généralisés (GLM) pour modéliser les abondances et la distribution des groupes cytométriques en relation avec les paramètres de niches, les traits, l'environnement et les descripteurs spatiaux. Les GLM sont préférés aux modèles généralisés additifs (GAM) parce qu'ils sont plus transférables dans l'espace et dans le temps que les modèles généralisés additifs (Randin et al., 2006). Les GLM

permettent également d'étudier plusieurs types de distribution possibles pour la variable réponse.

Une première ACP a été réalisée sur les groupes cytométriques caractérisés à haute fréquence en sub-surface (3 m). Elle a permis de caractériser les groupes cytométriques représentatifs des différents bassins traversés au cours de la campagne ARANDA. Une seconde ACP a porté sur les données environnementales acquises aux différentes profondeurs de chaque station. Elle a eu pour but d'observer l'agencement entre elles des stations et profondeur et potentiellement définir des sous-ensembles.

L'estimation des niches des groupes cytométriques a été effectuée par l'analyse Outlying Mean Analysis (OMI). La définition des sous-niches quant à elle s'est faite par l'analyse Within Outlying Mean Index (WitOMI) qui est un refondement de l'OMI en combinaison avec l'analyse K-select. Les significativités de l'OMI et de la WitOMI ont été testées par permutations aléatoires. Plus de détails sur la méthodologie de l'OMI et de la WitOMI sont fournis dans le préambule du chapitre précédent.

Douze traits ont été définis à partir des signatures cytométriques elles-mêmes dérivées des propriétés optiques de chaque particule et correspondent essentiellement à des traits morphologiques et physiologiques. Ces traits ont été utilisés pour calculer une distance entre les PFGs. La méthode de Gower a été utilisée pour ensuite produire une PCoA pour chaque sous-ensemble et chaque profondeur. L'utilisation des traits est telle que les traits servent à définir la performance écologique d'un groupe d'espèces et permet d'expliquer les abondances.

L'autocorrélation a été étudiée via la décomposition spectrale de la relation entre sites, définie à partir des coordonnées géographiques, et a été calculée via les vecteurs propres de Moran pondérés par la distance (db-MEM). Les premiers vecteurs propres ont été le reflet des variations à large échelle tandis que les derniers ont été le reflet des variations à petite échelle.

Le nombre de db-MEM produits correspond au nombre de stations considérées moins un. Les db-MEM ont été calculées apour chaque sous-ensemble et chaque profondeur ce qui a permis d'étudier séparément chaque système.

La comparaison de la performance des paramètres environnementaux, des paramètres de niche, des traits et de l'espace sur les abondances des différents PFGs a été réalisée via des modèles linéaires généralisés. La totalité des combinaisons a été testée via le critère d'information d'Akaike (AIC) et le modèle ayant l'AIC le plus faible représentait le meilleur modèle.

Les résultats de l'ACP sur les communautés caractérisées en sub-surface (gradient horizontal) ont pu mettre en évidence différents assemblages phytoplanctoniques suivant trois zones géographiques et hydrologiques: le golfe de Finlande avec les groupes PicoLowFLR, NanoHighFLR et MicroRED (groupes à dominance en fluorescence rouge, attribuée à la chlorophylle *a*), en Mer Baltique avec les groupes PicoORG, NanoLowORG et NanoHighORG, NanoLowFLR et MicroORG (groupe à dominance en fluorescence orange, attribuée à la phycoerythrine) et dans le Kattegat et le Skagerrak avec le groupe PicoHighFLR.

En ce qui concerne la dimension verticale, une PCA sur les paramètres environnementaux a permis de caractériser deux sous-ensembles : golfe de Finlande/Mer Baltique et Kattegat/Skagerrak. Une ségrégation verticale des groupes a été également observée. Les paramètres de niches ont montré une tendance des groupes à être généralistes sauf pour le groupe NanoSWS (Coccolithophorids). L'analyse de sous-niches a montré en revanche, une tendance des groupes à être généralistes dans les 15 premiers mètres de la colonne d'eau, correspondant à la couche de mélange. En dessous, les niches étaient fortement restreintes. La décomposition spectrale des relations entre les stations aux différentes profondeurs n'a pas permis de mettre en évidence d'autocorrélation spatiale, aussi bien à large échelle qu'à petite échelle. Les variables utilisées ont expliqué fortement les modèles GLM avec 33% à 88% de la variation expliquée. Dans tous les modèles, les traits fonctionnels se sont révélés les meilleurs

prédicteurs des abondances des différents groupes. Les paramètres de niches ont également été impliqués mais avec moins de puissance. Les abondances ont été positivement liées à la tolérance environnementale (amplitude d'utilisation des ressources) par les groupes. A l'inverse, les abondances ont été négativement corrélées à la marginalité (position de la niche dans l'espace écologique, qui correspond à l'utilisation des ressources pour chaque PFG par rapport aux ressources moyennes de la zone étudiée). Dans une moindre mesure, les paramètres environnementaux (i.e. les paramètres physico-chimiques) ont permis d'expliquer la distribution et les abondances : la salinité en Mer Baltique et golfe de Finlande et la température dans le Kattegat et le Skagerrak. Aucune implication de mécanismes de dispersion à large ou petite échelle n'a été observée.





**Untangling the vertical distribution of phytoplankton groups  
along a salinity gradient through the Baltic Sea and the  
Skagerrak-Kattegat straits.**

Arnaud Louchart<sup>1,2\*</sup>, Bengt Karlson<sup>3</sup>, Fabrice Lizon<sup>1</sup>, Sirpa Leithanen<sup>4</sup>, Lars Stemann<sup>5</sup>,  
François G. Schmitt<sup>1</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F 62930 Wimereux, France

<sup>2</sup> Department of Integrative Marine Ecology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, I-80121, Napoli, Italy

<sup>3</sup> Swedish Meteorological and Hydrological Institut, Oceanography, Sven Källfelts gata 15, SE-426 71 Västra Frölunda, Sweden

<sup>4</sup> Marine Research Laboratory, Marine Research Centre, Finnish Environment Institute, Agnes Sjöbergin Latu 2, 00790 Helsinki, Finland

<sup>5</sup> Sorbonne Université, CNRS, UMR 7093, Institut de la Mer de Villefranche-sur-Mer, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, 06230 Villefranche-sur-Mer, France

\*contact authors: [arnaud.louchart@gmail.fr](mailto:arnaud.louchart@gmail.fr)/[felipe.artigas@univ-littoral.fr](mailto:felipe.artigas@univ-littoral.fr)

**Abstract**

Phytoplankton dynamics depends on environmental parameters (physico-chemical) as well as ecological parameters. Trade-offs in biological traits allow the optimal use of resources which shape the ecological niches phytoplankton and induce their capability to develop in terms of abundance or biomass. Given the importance of niche position, niche breadth, functional traits, spatial descriptors and environment on phytoplankton distribution and abundance, a large transect of 2000km along a gradient of resources was investigated in the Baltic Sea and Skagerrak/Kattegat. An automated flow cytometer was applied for characterizing living phytoplankton groups. Two complementary sampling strategies were carried out. First, sub-surface waters were addressed using continuous measurements at high frequency (every 10 min) to resolve the fine horizontal spatial distribution of Phytoplankton Functional Groups (PFG). In the addition to high frequency measurements, 18 stations were investigated at 6 different depths. Ten PFG Groups were characterized. For each PFG, we applied Generalized Linear Models to sort the best predictors of phytoplankton abundance distribution along the water column using niche parameters (niche position and niche breadth), functional traits (morphological and physiological), spatial structure (through the Moran Eigenvector Maps) and environmental factors. The selection of the best reduced models was based on the best combination of variables for abundance prediction according to the Akaike Information Criterion. Continuous measurements at the sub-surface revealed the phytoplankton abundance structure at the sub-mesoscale (1 - 10 km) and mesoscale (10 - 100 km). In addition, phytoplankton communities clustered the study area into three well determined subsets based on the community composition: (i) the Baltic Proper and Sound, characterized by phycoerythrin- and phycocyanin-containing PFGs and NanoLowFLR, (ii) the Gulf of Finland, characterized by higher levels of chlorophyll *a*-containing PFGs and (iii) the Kattegat and Skagerrak which were mainly represented by PicoHighFLR group. On another hand, vertical

sampling showed heterogeneity in abundance distribution and phytoplankton assemblages over the three spatial dimensions. The lowest marginality was found at 15m in the Baltic Sea and the Gulf of Finland and at 5m in the Kattegat and Skagerrak. The lowest marginality is strongly related to the mixed layer depth but not to the euphotic depth zone. The Generalized Linear Models showed that the abundance-distribution heterogeneity in both subsets was rather explained by biological features of the PFGs instead of environmental parameters or spatial structures such as dispersal. The variation in the optical traits related to morphology and physiology appear to be the best predictors of the abundance-distribution models. They were followed by niche position and niche breadth. The environmental variables considered in the present study did not clearly structure the distribution of the PFG. Finally, no apparent spatial structure was involved in the models highlighting the absence of dispersal between the stations. Such findings may represent new considerations in predicting the amplitude of phytoplankton blooms as well as their spatial extent in coastal ecosystems based on the study of community shifts.

**Keywords:** Phytoplankton Functional Groups, niche position, niche Breadth, optical traits, distribution-abundance relationship, Generalized Linear Model, vertical distribution.

## 1. Introduction

Phytoplankton biomass (at least addressed as chlorophyll *a* concentration), abundance, taxonomical diversity and community structure are commonly monitored in surface coastal waters, such as recommended in several directives or monitoring programs (HELCOM, OSPAR, MSFD). Monitoring programs use traditional methods to assess weekly, fortnightly or monthly abundance, biodiversity and biomass of phytoplankton communities. Such spatial and temporal resolution can miss short-term events. In this context, innovative techniques can overcome this limitation by recording continuously and autonomously at higher frequency (from the second to several times per day). Furthermore, discrete temporal and surface spatial surveys of monitoring programs often miss the fourth dimension distributed along the water column. This omission can have consequences in stratified ecosystems, the water column being at least during some periods of the year, partitioned between nutrient-depleted surface waters and nutrient-rich waters below which strongly drives the vertical distribution of phytoplankton.

Several hypotheses explain the relation between spatial and/or temporal distribution and abundance of species or life-forms (detailed explanations are provided in Gaston et al 1997). They are derived from sampling strategy or analysis (sampling artefacts which could be related to insufficient sampling efforts carried out for rare species, phylogenetic non-independence, range position) and ecological considerations (resource breadth, resource availability, habitat selection, metapopulation dynamics, parasitism, grazing loss, vital rates). Amongst them, phylogenetic non-independence which is basically species features common among them and shared with a common ancestor (i.e. traits), resource availability (niche position), resource acquisition and usage (niche breadth), and metapopulation dynamics (dispersal which is related to spatial structure) have already demonstrated to be important in distribution-abundance relations. Indeed, key traits (*e.g.* cell size, pigment composition) are important because they separate ecological niches of phytoplankton by constraining or enlarging their capabilities in

resource acquisition and usage (Litchman and Klausmeier, 2008) as well as modifying ecological niches through negative interactions (grazing pressure or parasitism) or positive interactions (commensalism, symbiotic organisms). Consequently, the abundance often increases along a gradient of resource acquisition, dependently of level traits' values (Litchman et al., 2012). For example, the habitat availability (i.e. niche position) and the metapopulation dynamics play a role in the abundance and distribution. In this frame, generalist species generate high local abundance and wide regional distribution (Verberk et al., 2010). Such observation has already been stated in freshwater phytoplankton studies, in which occupancy has been related positively to habitat availability (Heino and Soininen, 2006). As abundance and occupancy are positively linked, we could infer a positive relation between abundance and habitat availability (i.e. niche position). Nevertheless, previous works explaining abundance variability through species characteristics, traits, space and environment were carried out essentially in terrestrial or freshwater ecosystems (Alahuhta et al., 2017; Heino and de Mendoza, 2016; Heino and Grönroos, 2014; Heino and Soininen, 2006). Furthermore, the little studies focusing on phytoplankton have only investigated diatoms (Heino and Soininen, 2006; Rocha et al., 2018), missing the picocyanobacteria and autotrophic pico- and nanoeukaryotes which are often reported as a substantial part of the phytoplankton abundance, biomass and/or primary producers in aquatic ecosystems (e.g. Seppälä et al., 2005; Stal et al., 2003).

Here, we focus on the Baltic Sea, a large semi-enclosed brackish ecosystem which is connected to the North Sea (at the West) by several narrow straits as the main Kattegat and Skagerrak. The physical and biological structure of water masses present spatiotemporal variation. Indeed, the continuous river inflow, the melting of sea ice coverage and small salinity intrusions coming from the straits maintain a pronounced horizontal salinity gradient from the East to the West all over the year, ranging from 1 in the Gulf of Bothnia and the Gulf of Finland (Rantajärvi et al., 1997) to 30 in the Skagerrak (Bratbak et al., 2011). Highest salinity values are always recorded

during summer across the whole system. The thermal amplitude in the Baltic Sea is large with winter values around 2°C and summer values in July-August between 19°C and 24°C. Nitrogen and phosphate are routinely monitored and present spatial and temporal heterogeneity. In the study area, nitrogen (nitrate + nitrite), phosphate and silicates reach their maximum in spring before a drawdown after the spring bloom and remain low in summer (Savchuk, 2018). The N:P ratio in summer is below the Redfield ratio (N:P = 16) and marked a strong nitrogen limitation in the Gulf of Finland, the Baltic Sea and the Kattegat (Savchuk, 2018) as well as in the Skagerrak (Bratbak et al., 2011). Investigating the vertical dimension, the surface mixed layer is separated from deep waters by a permanent halocline (60 - 70m-depth). In addition, a seasonal thermocline appears between 10 and 20m-depth in summer in the Baltic Proper and deeper in the Skagerrak. From the Gulf of Finland to the Skagerrak, summer stocks of nutrients are often recorded to be lower at the surface than below the halocline (Bratbak et al., 2011; Stoń et al., 2002; Wulff et al., 1990).

Following the hydrology and biogeochemistry of the Baltic Sea, biological structures of microbial communities mark horizontal-vertical heterogeneities in term of abundance, biomass and primary production (e.g. Hajdu et al., 2007; Lips et al., 2011; Wasmund and Uhlig, 2003). As ninety-seven percent of the Baltic Sea suffer of eutrophication (HELCOM, 2018), nutrients and phytoplankton community are strongly monitored especially the harmful bloom-forming large filamentous cyanobacteria in the Baltic Sea and toxic dinoflagellates in the Straits. Indeed, the balance between nutrients is mainly responsible for determining phytoplankton phenology in the area, i.e. starting at the end of spring with nitrogen depletion that leaves dissolved inorganic phosphorus abundant. This unbalance in nutrient ratios is suitable for the development of noxious bloom of filamentous diazotrophic cyanobacteria, in summer (Larsson et al., 2001). Different cyanobacteria are observed, *Dolichospermum sp.*, *Aphanizomenon sp.*, *Nodularia spumigena* and *Microcystis aeruginosa* they are widespread in the Baltic Sea but

unequally distributed along a longitudinal transect as well as in the water column (e.g. Eigemann et al., 2018; Hajdu et al., 2007). In addition, the Skagerrak benefits of warm, more stable and saline waters than the Baltic Sea in which several dinoflagellates forming sometimes Harmful Algal Blooms are able to grow (Smayda and Reynolds, 2001) as well as the haptophyte *Prymnesium* spp. (formerly *Chrysochromulina* spp.) which blooms can extend from the western Baltic Sea to the Skagerrak (Larsson et al., 2014).

Despite the Baltic Sea is strongly monitored in the horizontal dimensions with regular monitoring for discrete sampling as well as high frequency monitoring programs (Alg@line and Ferryboxes implementations; Kahru et al., 2007; Łysiak-Pastuszak et al., 2012; Petersen, 2014), the phytoplankton vertical distribution suffers from some technical issues at different levels. Most of the studies investigating the vertical distribution of phytoplankton focus mainly on cyanobacteria in the Baltic Sea and mainly on microphytoplankton in the Straits and in the Skagerrak, missing the marginal species as they are less impacted by eutrophication. A second point is related to the spatial coverage and the biases it can generate in species and bloom characterization. Indeed, studies investigating the water column are mainly focusing on laboratory (Arvola et al., 1991) or on mesocosm experiments (Eigemann et al., 2018; Olli and Seppälä, 2001) and very few of them directly on the field and integrating space (Hajdu et al., 2007; Lips et al., 2011). Among the studies investigating the distribution in water column across spatial scales, several of them concern the coast (Olli, 1999; Olli et al., 1998) and only few studies have investigated the offshore waters (Hajdu et al., 2007). Nevertheless, they studied limited spatial coverage (Hajdu et al., 2007) and when they considered large spatial scales, they were limited to bacteria (Herlemann et al., 2011), some genera (Stal et al., 2003) or to bulk analysis (Kahru et al., 2007, 1994; Karlson et al., 2016; Łysiak-Pastuszak et al., 2012). We have found only one article studying the whole phytoplankton in the whole Baltic Sea (Hu et al., 2016). Finally, this latter point lead use to consider the effect of the use of fixative method for



species determination which destroy or denature cell components which, in turn, alter some traits of the cells. Through our study, we aim at bringing new insights into the monitoring phytoplankton in the Baltic Sea. First, we studied the spatial distribution in the three dimensions (latitude, longitude and depth) of cytometry-defined phytoplankton functional groups (PFG) within the whole phytoplankton size range, from the small picocyanobacteria to the largest chains (several millimeters length) using *in vivo* characterization through an automated flow cytometer, for which we expected to highlight some spatial patterns. Then, we aimed at characterizing the niche parameters along a large longitudinal gradient of offshore stations and at several depths to test the spatial variability of the abundance along the water column. Marginality and environmental tolerance might be strongly linked to the gradient of resources and are expected to be larger in the upper part of the water column. Finally, we studied the abundance and distribution responses of the PFGs faced to space (both horizontal and vertical), niche parameters, traits and environment, to determine which of either biological or environmental parameters were the best predictor of the PFG distribution and abundance. For this, we used a generalized linear model within each area defined in this study and each depth, to untangle the relationship between these features and PFG distribution and abundance. The distribution of PFGs abundance through horizontal and vertical gradients should be strongly the traits expression of each PFGs as well as related to environmental variables as they modify the ecological niches and induce trade-off in the use of resources. Along the water column, community changes are expected between close stations. Such models could predict the abundance in the community assemblages by investigating the traits and niches shift through environmental gradients which are particularly in productive ecosystem such as coastal waters, integrating the information detected in the horizontal and vertical dimensions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study area

The Aranda cruise was part of regular monitoring in the Baltic Sea of the Swedish Meteorological and Hydrological Institute (SHMI) and was carried out in the Baltic Sea onboard the R/V “Aranda” (Finnish Environment Institute; SYKE) from the 10 July to 17 July 2017, in the frame of the JERICO-NEXT (Joint European Research Infrastructure network for Coastal Observatory - Novel European eXpertise for coastal observaTories) H2020 project. The cruise started in Helsinki and crossed the Baltic from East to the West reaching the Skagerrak and back to Helsinki. Eighteen discrete stations were sampled from the Gulf of Finland to the Skagerrak (Fig. 52). The Anholt station located in the Kattegat was sampled twice, once on the way to go and once on the way back. Two stations were part of the Gulf of Finland, nine concerned the Baltic Proper, four in the Kattegat and three in the Skagerrak area. The nearest stations were A13 and Släggo which were separated by 26 km, whereas Släggo to Hanobukt stations were the most distanced ones (360 km) on the way back to the Baltic Sea. The mean distance between paired of stations was  $139.8 \pm 99.2$  km.

### 2.2. Vertical and horizontal sampling

At discrete stations, water samples were taken at six depth (0, 5, 10, 15, 20, 30 m) with  $12 \text{ dm}^{-3}$  Niskin bottles mounted on a rosette equipped with a SeaBird 911+ CTD (SeaBird Inc.) for temperature, salinity, oxygen, fluorescence measurements and PAR. Inorganic nutrients were analyzed using standardized methods for international monitoring of the Baltic Sea (HELCOM, 2017). Between the stations, subsurface waters were continuously pumped at a depth of ca. 3 m for high frequency routine measurements processed by a FerryBox and phytoplankton monitoring detailed in the following part. Both euphotic depth ( $Z_e$ ) and Mixed Layer Depth (MLD) are calculated from CTD data. We defined the euphotic depth as the depth at which remains 1% of the PAR from the PAR measured at 1m-depth. MLD was

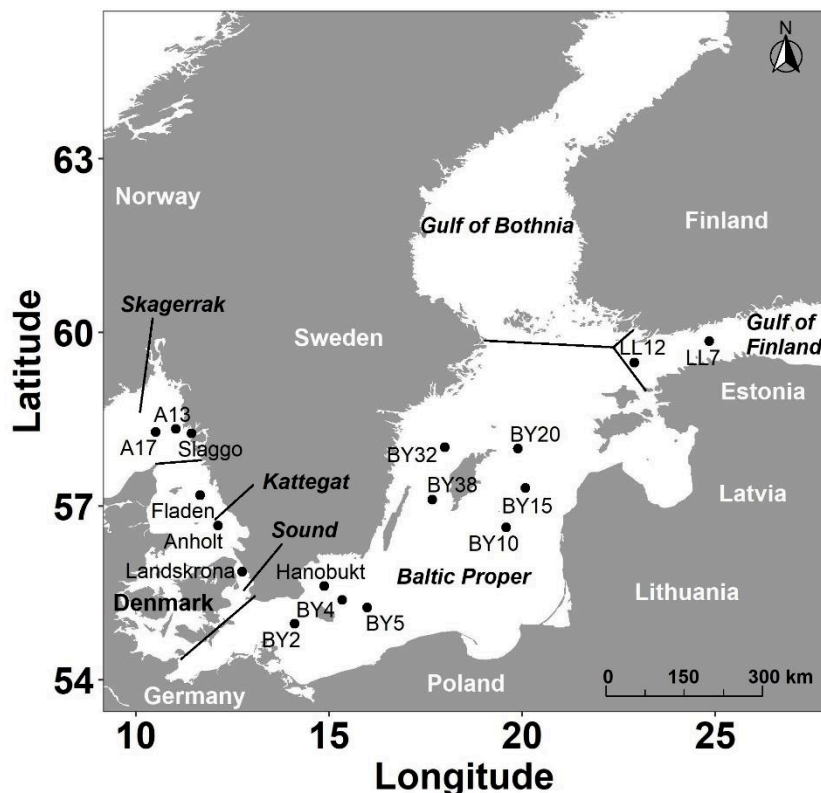


Figure 52 : Map of the 17 stations investigated in the Baltic Sea and in the Skagerrak-Kattegat during the Aranda cruise (10 to 17 July 2017). The cruise has started and finished in Helsinki (Gulf of Finland) and crossed the Baltic Sea to station A13 (Skagerrak).

### 2.3. Phytoplankton functional groups (PFG) estimated by flow cytometry

Phytoplankton community composition was assessed by a CytoSense<sup>®</sup> (CytoBuoy<sup>®</sup> b.v., Netherlands) at each measurement and each depth. The CytoSense is an automated flow cytometer which records the optical pulse shape of each particle passing through a 5  $\mu\text{m}$ -width blue laser (Coherent Inc., 488 nm, 50 mV), thus, a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM). The intersection results in scattering the light at narrow angles (Forward Scatter, FWS) and large angles (Sideward Scatter, SWS). Auto-fluorescent cells such as phytoplankton are characterized by three fluorescence emission: red fluorescence (668-734 nm) as the autofluorescence of the PSII of the chlorophyll *a*, orange fluorescence (604-668 nm) as the phycoerythrin and part of the phycocyanin fluorescence and yellow fluorescence (536-601 nm) as decaying pigments and part of the phycocyanin fluorescence. We applied a trigger level on

the red fluorescence in order to separate non fluorescent cells and inorganic particles from phytoplankton. The pulse shape of cells and colonies from 1  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$ -width and few mm-lengths were recorded. The trigger level used for the discrete analysis was set up to catch all eukaryotic picophytoplankton and pico-cyanobacteria (trigger level: FLR 7 mV; acquisition time: 300s, sample flow rate: 5.0  $\mu\text{L s}^{-1}$ ). Nevertheless, this procedure affects the FWS and the SWS such as mentioned by Thyssen et al. (2015). The size of the particles remained biased without prior correction. To avoid this issue, a set of beads (3  $\mu\text{m}$  488nm Cyto-cal™ alignment standards, and 10  $\mu\text{m}$  orange Invitrogen polystyrene fluorospheres) were used to correct the size (length of the FWS) using the formula (eq. 13 and 14) given by Bonato et al. (2015):

$$\text{Correction factor} = \text{real beads size} / \text{Measured beads size} \quad (13)$$

$$\text{Estimated particles size } (\mu\text{m}) = \text{Measure particles size} \times \text{Correction factor} \quad (14)$$

Between the stations, the flow cytometer was used in its continuous configuration. The protocol used the same trigger level (FLR: 7 mV) with an acquisition time automatically set up every 10 min (including a flush of 1 min) for a analyzed sample volume of 1.5/2.5 mL. Based on the mean speed of the ship (12 knots) the spatial resolution was 3.7 km. According to the definition given by Reynolds (1997), the phytoplankton sharing similar morphological, physiological and/or ecological properties can be grouped together to form a Phytoplankton Functional Group (PFG). Six PFGs were labelled from their optical characteristics in the area, according to the criteria of the common vocabulary available for automated flow cytometry measurements (<https://vocab.nerc.ac.uk/collection/F02/current>): *Synechococcus* (called here PicoORG as it may include other cyanobacteria), picoeukaryotes, nanoeukaryotes (of high chl *a* content), Cryptophytes, Coccolithophorids and Microphytoplankton. Within some PFGs, it was sometimes possible to characterize some sub-groups differentiated by their size, fluorescence level and/or internal composition. In the Baltic Sea, the level of characterization of the sub-groups was based on the different red and orange fluorescence levels among PFGs. The

characterization of a group or sub-group was effective when all cells formed a bulk of particles sharing similar optical properties, of one single distribution mode, and optically different from other PFGs. The traditional manual gating method is used here to characterize them and is assessed with CytoClus<sup>®</sup> software (Cytobuoy b.v., Netherlands). Thus, picoeukaryotes were sub-divided into three sub-groups: PicoVeryLowFLR, PicoLowFLR and PicoHighFLR; red fluorescent nanoeukaryotes were sub-divided in two sub-groups: NanoLowFLR and NanoHighFLR. Two sub-groups were characterized within the phycoerythrin-containing nanoplankton: NanoLowORG and NanoHighORG. Their might have been Cryptophytes, such as identified by microscopy in the Skagerrak, the South of the Baltic Sea and the Western Baltic Sea. However, they also could be small colonies of cyanobacteria as *Snowella* spp., *Aphanothece* spp. and *Aphanocapsa* spp. which were also identified. Finally, Microphytoplankton was sub-divided into MicroORG (dinoflagellates with phycoerythrin, colonies and filamentous cyanobacteria) and MicroRED (autotrophic dinoflagellates and diatoms).

#### 2.4. Statistical analysis

Prior to the main analysis, the horizontal structure of the communities was investigated using a Principal Component Analysis (PCA) using the logarithm of each PFG. The PCA was computed using the *dudi.pca* function from the R 'ade4' package. Then, the study of the vertical distribution required four types of data sets on discrete samples: Phytoplankton Functional Groups (PFG), phytoplankton traits, geographical coordinates and environmental variables. First, we ran a PCA on the environmental variables (NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, DIN Total Nitrogen, SiO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>, Total Phosphorus, O<sub>2</sub>, temperature, salinity and depth) to visualize how stations were arranged between them. We observed two regional ensembles: the Kattegat with the Skagerrak and the Baltic Proper with the Gulf of Finland. Then, we computed a general analysis to calculate the PFGs niches, the Outlying Mean Analysis (OMI, Dolédec et al., 2000) in order to

identify a common origin of the two subsamples (Kattegat/Skagerrak and Baltic Sea/Gulf of Finland). The OMI analysis was conducted through the *niche* function of the package ‘ade4’ on Hellinger-transformation on the abundance. Within each regional ensemble, we calculated the WitOMI with the *subniche* function from ‘subniche’ package (Karasiewicz et al., 2017), which uses the common origin of the OMI. Both OMI and WitOMI analysis are multivariate indexes which allow the quantification of niche parameters and explain the variability of PFGs to the selected environment. They provide the niche position which quantifies the marginality of the PFGs and the niche breadth, *i.e.* the tolerance which is the variance of the marginality. Marginality is defined as the distance between the mean habitat conditions used by the functional unit and the mean habitat conditions over the entire studied area. Thus, marginal PFGs are stated to be specialist for resources whereas non-marginal PFGs are generalists for resources (referring to their resources acquisition patterns) or ubiquitous (spatial distribution). In addition, large values of tolerance mean that a PFG owes a wide niche breadth whereas small values of tolerance mean that a PFG owes a narrow niche breadth. Three kinds of observations are usually met: (i) generalists, (ii) specialist and non-marginal and (iii) specialist and marginal (Heino and de Mendoza, 2016).

Spatial predictors were derived from geographic coordinates (latitude and longitude) to produce a distance-based Moran Eigenvector’s Map (db-MEM) which aims at identifying the scale of the spatial autocorrelation. This analysis represents a spectral decomposition of the spatial relationship among the sites. Consequently, the first eigenvectors represent broadscale variations whereas the last eigenvectors represent small-scale variations. In this study, we ran the db-MEM separately on each spatial subset (*i.e.* Kattegat-Skagerrak vs. Baltic Proper-Gulf of Finland) to define the spatial structure. Therefore, spatial eigenvectors were specific to each subset hence they were not directly comparable. The db-MEM was calculated with the *dbmem* function from the ‘adespatial’ package and only the statistically significant MEM was kept.

Twelve traits were derived from the optical signals and reviewed from previous CytoSense studies (Fontana et al., 2018; Fragoso et al., 2019; Louchart et al., 2020; Pomati and Nizzetto, 2013). They were assimilated to morphological (e.g. size, asymmetry of the cell...) or physiological traits (e.g. autofluorescence of the chlorophyll *a*, chlorophyll *a* and phycoerythrin per volume unit...). A strong collinearity between yellow and orange fluorescence was noticed. Consequently, yellow fluorescence was removed from the traits to finally keep only ten traits for further analysis. The detail of the traits used for the final analysis are reported in the table 3 of the Material and Methods chapter. These traits were used to calculate traits distance between PFGs. For this, we applied the procedure described by Villégier et al. (2008). First, we ran a Gower distance using the *gowdis* function of the 'FD' package to process a PCoA with the *cmdscale* function of the R package 'stat'. We set the Euclidean distance for the PCoA to produce positive eigen values. Due to the small number of discrete traits obtained by the flow cytometer, only the first two PCoA axes were used in the analysis. They captured the trait space and were used to obtain the difference between each PFGs traits value related to the mean of the whole PFGs traits value. One trait vector was assumed to represent the morphological traits and the other trait vector was assumed to represent the physiological traits. The traits vectors represented, on the contrary to the original traits, continuous traits. For accurately using PCoA to capture the traits differences, we assumed the hypothesis that 'the ecological performance of a species is controlled by multiple traits' to explain its abundance (Verberk et al., 2013) and we apply it to our PFGs. This hypothesis is even stronger in our case as our PFGs are optically (i.e. defining different traits) distinct from each other, by avoiding the functional redundancy.

Finally, we used a generalized linear model (GLM, family = gaussian) to untangle the relation between the environment, space, traits and niche parameters in the PFG abundance composition in the water column of the two areas. GLM models were preferred to GAM models as they are easier to transfer across space and time than GAM (Randin et al., 2006). Furthermore, GLM

allows the investigation of several type of distribution. We conducted these analyses with the *glm* function of the R 'stat' package. Predictions models of the abundance were investigated through the *step* function and the best fitted model was defined according to the lowest AIC criterion. A second model was processed on the reduced model to obtain the adjusted deviance ( $D^2$ ). All the analyses were carried out on R 3.6.1.

### 3. Results

#### 3.1. Horizontal sub-surface distribution of Phytoplankton Functional Groups

Nine PFGs were characterized from the continuous measurements at the sub-surface. For each of them, samples showed large variations of their abundance and a spatial heterogeneity in their distribution (Fig. 53). The most abundant groups reached up to  $10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$  including PicoORG, PicoLowFLR, NanoLowFLR and NanoHighORG. The less abundant groups never outreached  $10^2$  cell  $\text{mL}^{-1}$  and were MicroORG (max.: 684 cell  $\text{mL}^{-1}$ ) and MicroRED (max.: 62 cell  $\text{mL}^{-1}$ ). Phycoerythrin and/or phycocyanin-containing groups were very abundant in the whole Baltic Proper, mainly between  $16^\circ$  and  $20^\circ$  East. However, NanoLowORG were more abundant in the south of the Baltic Proper (max.: 7 600 cell  $\text{mL}^{-1}$ ), between  $12^\circ$  and  $17^\circ$  East, than in the rest of the locations (max: 3 762 cell  $\text{mL}^{-1}$ ). Moreover, PicoORG showed maximum abundance between  $19^\circ$  and  $21^\circ$  in the Eastern Baltic Proper and NanoHighORG showed a very isolated peak in the Western Baltic Proper around  $17^\circ\text{E}$ . PicoLowFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR and MicroRED groups were most of the time very abundant in the Baltic Proper and in the Gulf of Finland (except for NanoLowFLR; Fig. 53). PicoLowFLR was ubiquitous of the Baltic Proper and the Gulf of Finland (mean:  $37\,085 \pm 12\,273$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) but their abundance remained low in the Kattegat and Skagerrak (mean:  $14\,126 \pm 8\,620$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ). The opposite was observed for PicoHighFLR and the maximum abundance was recorded at 1 604 cell  $\text{mL}^{-1}$  in the Kattegat and Skagerrak (mean:  $412 \pm 462$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ). In the Baltic Proper and the Gulf of Finland, PicoHighFLR abundance was low (mean:  $68 \pm 57$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ). NanoLowFLR was the



most ubiquitous group mainly in the Baltic Proper (abundance reached up to 22 000 cell mL<sup>-1</sup>), decreasing towards the Kattegat and the Gulf of Finland, where it showed maximum abundance values of 7 617 cell mL<sup>-1</sup>. The highest abundance of NanoHighFLR and MicroRED were observed in the Gulf of Finland and in the Eastern Baltic Proper (between 21° and 22°E) and reached respectively up to 1 696 cell mL<sup>-1</sup> and 62 cell mL<sup>-1</sup> in the Eastern Baltic Proper.

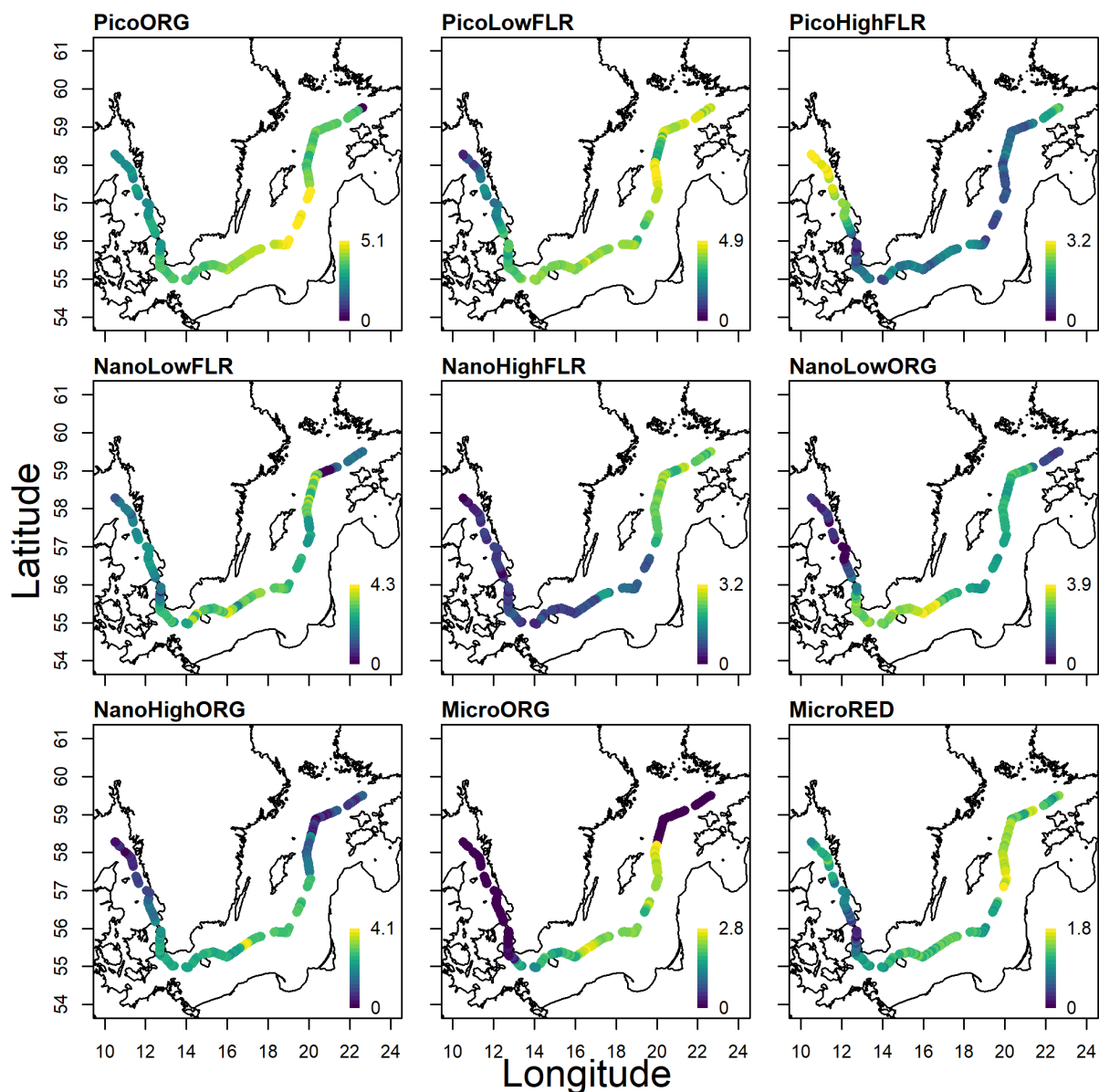


Figure 53 : Horizontal distribution of the Phytoplankton Cytometric Groups logarithmic abundance characterized in the Baltic Sea. Note that for some groups (NanoLowORG, NanoHighORG, MicroORG and MicroRED), we refer to cell mL<sup>-1</sup> but they could also be colonies mL<sup>-1</sup>.

Spatial trends in the community composition were addressed using a PCA (Fig. 54). The two first axis accounted for 69.6% of the total variation. Such as observed with the abundance, four spatial assemblages were observed: first, the Gulf of Finland, then, the Baltic Proper and the Sound (Baltic part closest to the Danish straits) and finally, the Kattegat and the Skagerrak. PicoLowFLR, NanoHighFLR and MicroRED characterized the Gulf of Finland. All the groups containing phycoerythrin were mainly observed in the Baltic Proper and in the Sound, which is the area joining the Baltic Sea and the Kattegat. PicoHighFLR was typical of the Kattegat and the Skagerrak.

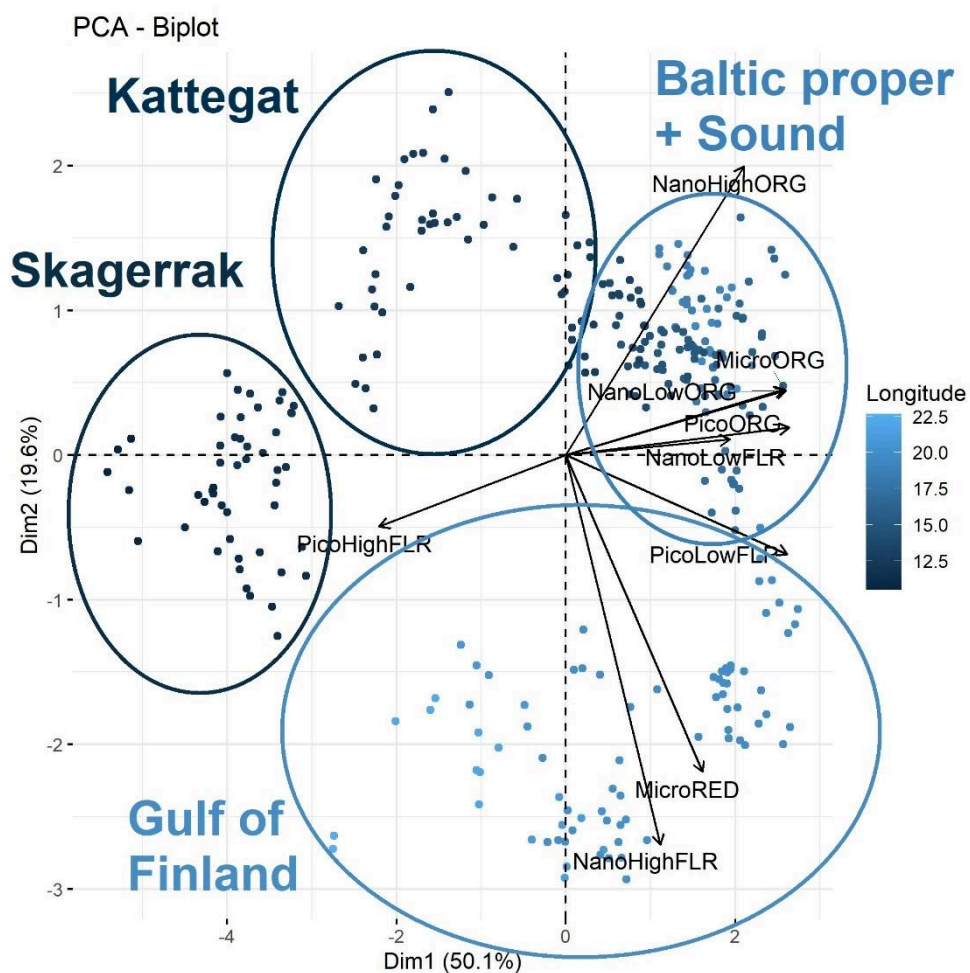


Figure 54 : Principal Component Analysis on the communities recorded continuously at the subsurface. The color gradient was established according to the longitude of the samples. Light blue corresponded to western samples and dark blue corresponded to eastern samples.

### 3.2. Vertical water column distribution of Phytoplankton Functional Groups

Ten PFGs were characterized in discrete samples taken at different depths. Depth-investigation of phytoplankton abundance revealed horizontal and vertical gradient and highlighted a segregation between Phytoplankton Functional Groups (PFGs) in the study area (Fig. 55). At BY20, B15 and BY10, high abundance of PicoORG were recorded across the whole mixed and euphotic layers. The maximal abundance was reached at BY10 at 15m depth ( $196\,930\text{ cell mL}^{-1}$ ) right below the mixed and euphotic layers. While sailing towards the Kattegat and Skagerrak, the maximum was recorded deeper into the water column, well below the bottom of the mixed and euphotic layers. High abundance of PicoLowFLR (Fig. 55A and 56B) reached up to  $76\,590\text{ cell mL}^{-1}$  at -15m depth at BY5 station. PicoLowFLR was especially abundant above the mixed layer depth (MLD). The lowest abundance was recorded in the Kattegat and Skagerrak. PicoHighFLR was very abundant in the Gulf of Finland (station LL7) above the MLD ( $\text{MLD}_{\text{LL7}} = 7.5\text{ m}$ ) and the bottom of the euphotic zone. This PFG exhibited also high abundance in the Western Baltic Sea (BY5, BY4, BY2 and Hanobukt Stations), being higher below the MLD than above (Fig. 55C). A large patch of NanoLowFLR cells reached up to  $13\,164\text{ cell mL}^{-1}$  (Fig. 55D). It was recorded in the Western Baltic Sea at the surface (BY5, BY4, BY2 stations). This patch became slightly deeper (sub-surface-3m) while moving to the Sund and Kattegat (Landskrona and Anholt stations). The highest abundance was always recorded above the MLD and the euphotic depth ( $Z_e$ ). NanoHighFLR maximum abundance was recorded at 15 meters depth at Hanobukt (Fig. 55E). This patch was observed below the MLD ( $\text{MLD}_{\text{Landskrona}} = 6\text{ m}$ ) and above the euphotic depth ( $Z_e = 9.6\text{ m}$ ). Spatial patterns of NanoLowORG and NanoHighORG were similar to each other. The maximum abundance was recorded in the Eastern Baltic Sea, at LL7 for NanoHighORG (max:  $4\,321\text{ cell mL}^{-1}$ ) and at BY10 for NanoLowORG (max:  $54\,737\text{ cell mL}^{-1}$ ). At BY10, both NanoLowORG and NanoHighORG showed distinct patches of high abundance at 5 m (above the MLD and  $Z_e$ ) and

at 15 m (below the MLD and  $Z_e$ ). A patch of high abundance of MicroORG (Fig. 55I) occurred also at BY10, from the surface to 10m (max: 5 673 cell mL<sup>-1</sup>). In the continuous measurement, we were not able to characterize NanoSWS group. Due to longer acquiring time, the number of particles detected in each group was higher. As NanoSWS was rare and their distribution was scarce, they might have been mixed up with other PFGs (e.g. large chl *a* containing nanoeucaryotes). Their presence in the Kattegat, the Sound (Fladen, Landskrona, Anholt and Hanobukt; Fig. 52 & 55) and the absence in the Baltic Sea has already been studied (Hu et al., 2016). Their abundance were high from the sub-surface to -10m, following the euphotic depth while moving towards the Skagerrak (Fig. 55H). MicroRED showed high abundance values from the surface to 5m depth at LL12 (Eastern Baltic Sea) and a large horizontal patch at 5m from the Sund to BY 38, in which MicroRED reached up to 151 cell mL<sup>-1</sup>, in Hanobukt (Fig. 52 & 55). Spatial high abundance was limited in the depth by the MLD.

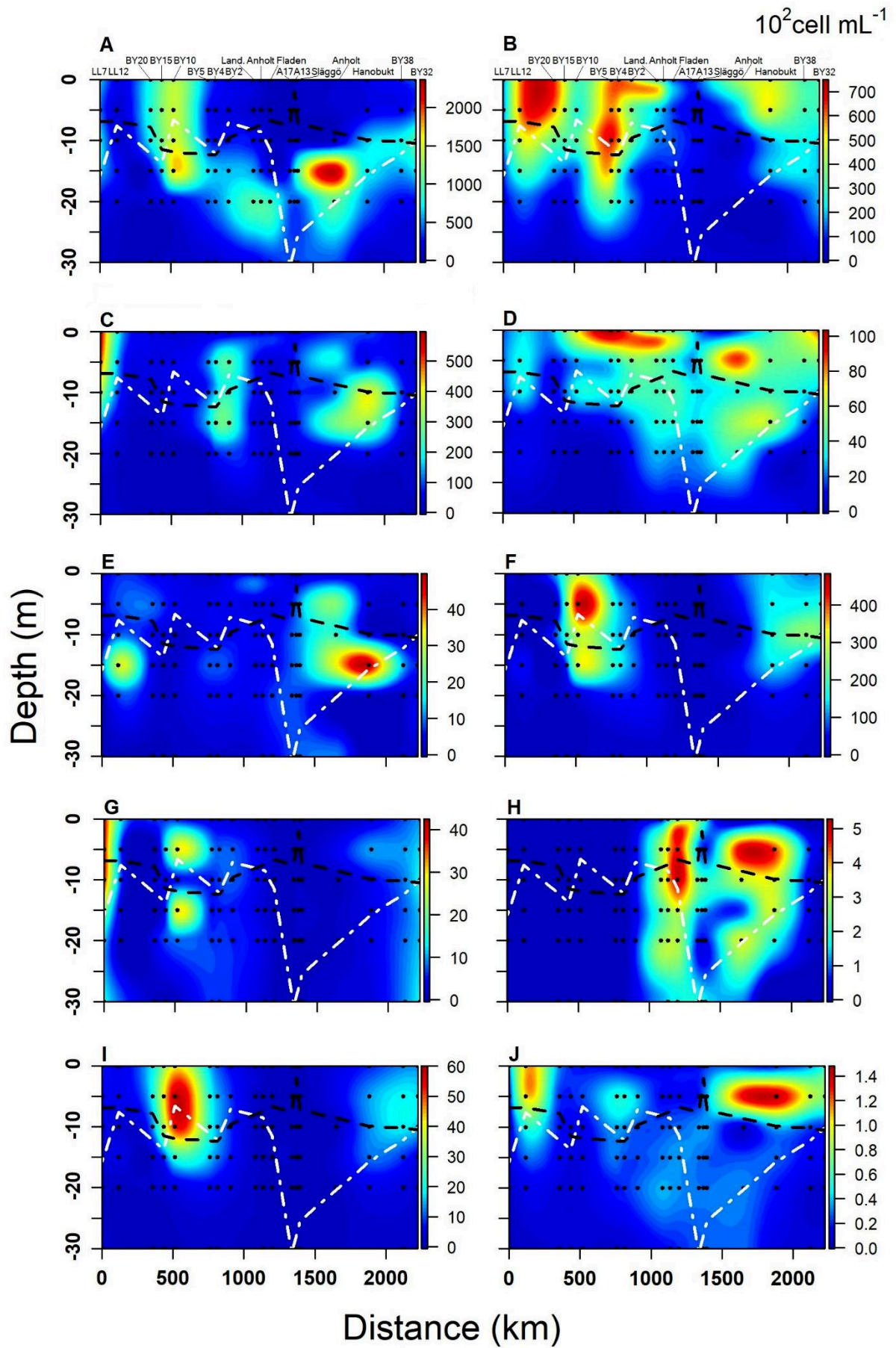


Figure 55 : Vertical distribution of Phytoplankton Functional Groups (PFG) along the cruise (“x” axis = distance travel by the vessel since the start of the cruise). A. PicoORG; B. PicoLowFLR; C. PicoHighFLR; D. NanoLowFLR; E. NanoHighFLR; F. NanoLowORG; G. NanoHighORG; H. NanoSWS; I. MicroORG; J. MicroRED. The white dashed curve represents the euphotic depth calculated from the PAR of the CTD. The black dashed curve represents the mixed layer depth calculated from the temperature data of the CTD.

### 3.3.Niche and subniche parameters

This prior PCA to define the subset was illustrated in the supplementary material (annex VII). This prior PCA for the Outlying Mean Index analysis explained 68.7% of the total amount of variance. The stations were differentiated into the two main regions of the study area (i.e. Kattegat/Skagerrak and Gulf of Finland/Baltic Sea) along axis 1. The sampling depths were differentiated along axis 2. For this reason, we decided to study each depth separately inside each main region. The PCA were re-run without the depth to avoid the redundancy with the subsetting and we obtained the input PCA of the OMI analysis (Fig. 56). The two first axes of the Outlying Mean Index analysis explained 97.2% of the total amount of variance of PCA (Fig. 56). TP, SiO<sub>3</sub>, TN and O<sub>2</sub> were strongly and positively correlated with the axis 1 (Fig. 56) whereas salinity was negatively correlated with it. The axis 1 evidenced a freshwater gradient with high nutrient inputs related to very low salinity. NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> were positively correlated with the axis 2 whereas temperature was negatively correlated to this axis.



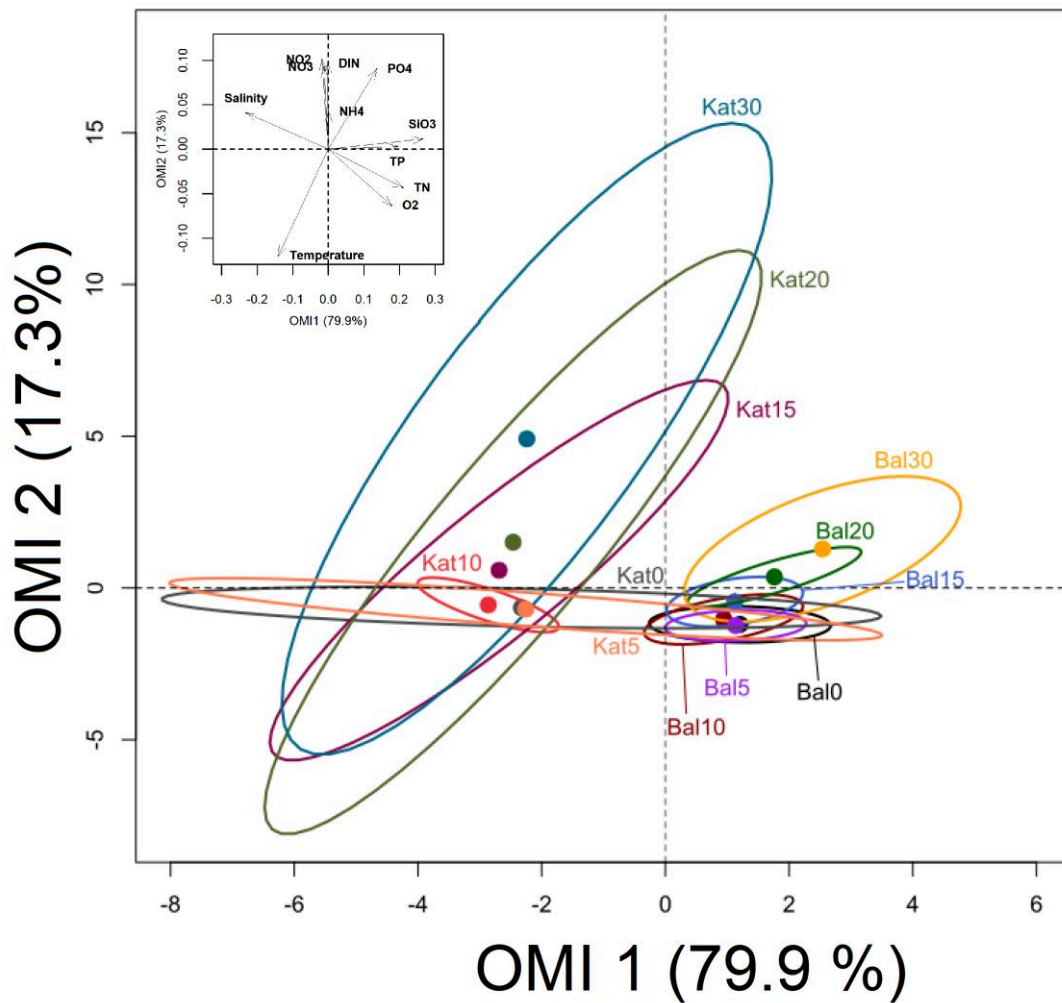


Figure 56 : Factorial plan of the OMI analysis (contribution of OMI 1 and OMI 2 axes = 97.2% of the total of the variance) and the confident ellipses (representing 95% of the environmental gradient) of each sampling depth of the Kattegat/Skagerrak and the Baltic Proper/Gulf of Finland subset. “Bal” sampling grouped Baltic Proper and Gulf of Finland sampling stations and “Kat” grouped Kattegat and Skagerrak sampling stations. The digits were related to the sampling depths. Note: the PCA displayed in the corner and the OMI analysis are using the same factorial plan.

In the OMI analysis, PFGs were grouped according to their marginality (OMI) and their tolerance to the environment. Most of the PFGs that were characterized by a low marginality showed a high tolerance to the environment. This pattern was observed for PicoORG (OMI: 0.08; Tol: 3.65), PicoLowFLR (OMI: 0.11; Tol: 2.54), PicoHighFLR (OMI: 0.26; Tol: 3.70),

NanoLowORG (OMI: 0.33; Tol: 2.91), NanoLowFLR (OMI: 0.62; Tol: 4.36), NanoHighFLR (OMI: 0.46; Tol: 4.91), MicroORG (OMI: 0.70; Tol: 2.37) and MicroRED (OMI: 0.24; Tol: 4.78). NanoHighOrg showed a relatively high marginality and a high tolerance compared to other groups. In the opposite, only NanoSWS PFG exhibited the highest marginality with and the lowest tolerance to the environment (OMI: 5.84; Tol: 1.67). The residual tolerance was calculated between 47% and 71% showing that a large part of the variability of the abundance of the PFG was not explained by the environmental parameters selected here.

The subset procedure was used as input of the WitOMI analysis. On the figure 56, each ellipse contained 95% of the data of each subset and this also for each depth. The size of the ellipses increased with depth. A small ellipse means that the environment conditions between the stations was more homogeneous than for large ellipses. The ellipses were larger in the Kattegat/Skagerrak subset (Kat) than in the Baltic Proper/Gulf of Finland subset (Bal). Consequently, there were higher gradients at each different depth in the Kattegat/Skagerrak than in the Baltic Proper/Gulf of Finland. Following the axis 2, the environmental gradient increased as going deeper in the water column. The projection of the environmental parameters on the factorial plan of the PCA showed that the ellipses representing the Kattegat-Skagerrak subset at the surface and at five meters partially overlapped the ellipses of the Baltic Proper-Gulf of Finland subset. Such observation would be related to the surface water exchanges in the Danish Straits (Sound in the figure 52, included in Kattegat - Skagerrak subset) between the Kattegat-Skagerrak and the Baltic Sea.

The WitOMI approach uses the same factorial plane as the OMI analysis (Karasiewicz et al., 2017). Consequently, the WitOMI allowed the comparison of the vertical sub-niches of the Baltic and Kattegat subsets through the same environmental gradient (Fig. 56, annex VII). Within this analysis, the WitOMIG is obtained and corresponds to the deviation of a PFG within a subset compared to the overall average habitat conditions. The WitOMIG calculated in the



Baltic area showed, for each group, a decrease in the marginality from the surface to fifteen meters-depth. Then, from fifteen to thirty meters-depth, the marginality strongly increased. The marginality values at thirty meters were the largest recorded in the water column in the Baltic area (Annex VIII). A different pattern was observed in the Kattegat/Skagerrak area. A low marginality was calculated there, which decreased from the surface to five meters as well as from ten to fifteen meters, after a small increase from five to ten meters. Then, from fifteen up to thirty meters, the marginality increases again to reach values larger by three to four-times the maximum values of the marginality recorded in the Baltic area (Annex VIII). Surprisingly, the values of the marginality were smaller in more constrained environmental areas than in areas exhibiting large environmental characteristics.

### 3.4.db-MEM

The db-MEM analysis decomposed the spatial relationship between the sites from large scales (firsts eigenvectors) to small scales (lasts eigenvectors). Consequently, the db-MEM analysis is powerful to reveal the scale of phytoplankton patches. The analysis concerned each area (Baltic Proper-Gulf of Finland and Skagerrak-Kattegat) for each depth sampled with the flow cytometer. The analysis produced one significant spatial eigenvector in the Kattegat-Skagerrak (MEM 1) whereas two were produced in the Baltic Proper-Gulf of Finland (MEM 1 and MEME 2). Thus, an autocorrelation was evidenced at the largest scales whereas the absence of autocorrelation for the pairs of the closest stations (A13 to Släggo: 26 km) evidenced an absence of structure at their scale as well as at the regional scale.

### 3.5.PCoA Traits from the PFGs traits

The number of PFGs involved in the PCoA analysis were 10 but continuous traits transformation to PCoA eigenvalues (number of PFGs at each station multiplied by the number of stations at a sampling depth) are comprised between and results in 38 PCoA axis in Kattegat-Skagerrak at the surface and 58 PCoA axis in the Kattegat-Skagerrak and Gulf of Finland-Baltic

Sea at 15m. The two first axis (Figure 57) retained between 40% (Gulf of Finland-Baltic Sea at 30m) to 48% (Kattegat-Skagerrak and Gulf of Finland-Baltic Sea at 5m) of the trait variation. Less than 8% of the total trait variation was explained for each axis starting from the third one. Consequently, the first two axes were kept as they retained most of the information about the original sets of traits. In addition, we also assume that the two first axis captured the morphological and physiological information of the traits and adding more axis would have increase the complexity the definition of traits types. In both subsets (Kattegat-Skagerrak and Baltic Proper-Gulf of Finland), the scores of the physiological traits are better correlated with the axis 1 than with the axis 2. The opposite pattern was observed for the morphological traits. In the Kattegat-Skagerrak, the PFGs are pooled together and there are no cluster of single or sharing optical similarities PFGs. In the Baltic Sea and the Gulf of Finland, some PFGs seems to have common traits. We found that both Microphytoplankton groups (MicroRED and MicroORG) were likely to share common trait's value due to their large size and their large volume (sphere trait). Another cluster was composed by PicoHighRED, NanoLowRED, NanoHighRED and NanoHighORG. The PFGs in this cluster were sharing large chlorophyll *a* content per cell's volume (Chla\_Vol). Finally, PicoORG, PicoLowRED and NanoLowORG shared common traits and this cluster was mainly driven by the asymmetry of the cells and large phycoerythrin content over chlorophyll *a* (PE\_Chla). The structuration in cluster was independent of the sampling depth.

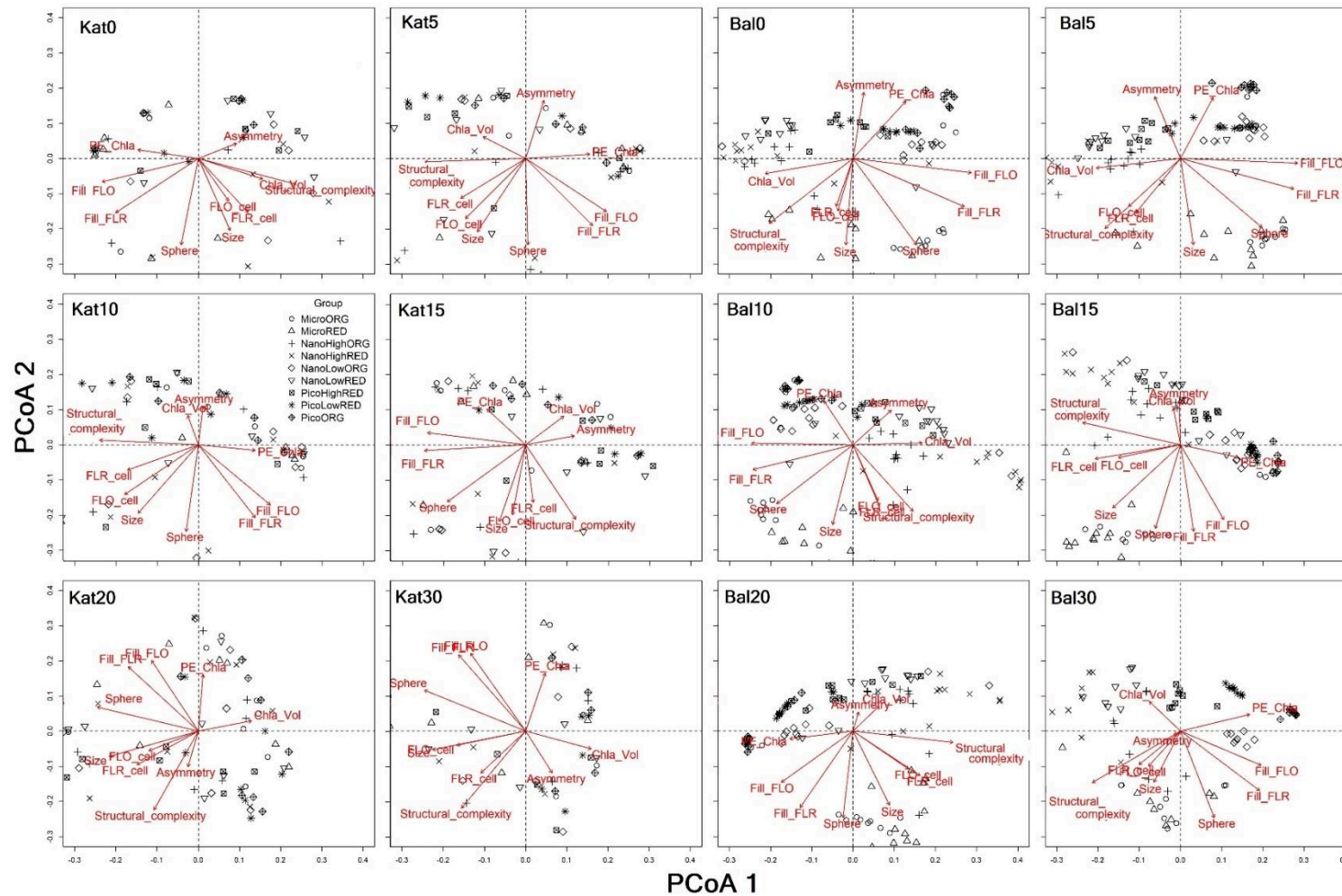


Figure 57 : PCoA ordination plot showing the distance amongst the PFGs characterized in the discrete stations and based on 10 traits for the two first axis. One PCoA was drawn for each subset and each depth.

### 3.6. Community models

Generalized linear models (GLM, family = gaussian) were used to untangle the relation between the abundance-distribution of the PFG and the environment, the space, the traits and the niche parameters. First, the analysis was run on the full data set for each subset and depth. The best fitted model (i.e. the set of variables explaining the best the relationship) was obtained according to the lowest Akaike Information Criterion. All the models obtained were statistically strong (38% to 88% of the variation was explained).

The table 12 summarized the model calculated in the Baltic Proper-Gulf of Finland at 0, 5, 10, 15, 20 and 30 m-depth. The amount of variation captured by the models ranged 73% to 86%. The highest percentage was obtained at the surface and the lowest at 30m-depth. At each depth, the PCoA1 and PCoA2 axis were significantly involved in the model. They were the best predictors in our models as they were the only variables involved in each model. Niche position negatively but significantly explained the distribution and the abundance at each depth except at 15m. In other words, a PFG with a marginal niche would be less abundant than a PFG with a non-marginal niche. Niche breadth was positively composing our models although it was absent at 10m and 15m-depth. This positive influence means that specialists PFGs would exhibit lower abundance than generalists, under the same environmental conditions. Salinity was the only environmental variable recurrent in the models of the Baltic Sea. It was significant at 10, 15, 20 and 30m-depth. At 10 and 15m-depth, the salinity had a positive influence on the abundance whereas at 20 and 30m-depth, the salinity had a negative contribution on the abundance. Others variables were significantly involved in the models but no clear pattern could be found.

Tableau 12 : Reduced generalized linear model based on the Akaike Information Criterion for each depth in the Bal area (Baltic Proper and Gulf of Finland).

	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>Adjusted D<sup>2</sup></i>
Surface					0.86
Intercept	58.40	37.92	1.54	0.13	
NP	-0.45	0.22	-2.08	<b>0.04</b>	
NB	2.33	1.06	2.21	<b>0.03</b>	
MEM1	1.10	0.57	1.92	0.06	
Temperature	-0.37	0.23	-1.60	0.11	
Salinity	-3.71	2.37	-1.57	0.12	
TN	0.47	0.26	1.84	0.07	
TP	-2.20	1.36	-1.62	0.11	
NO2	-92.19	50.93	-1.81	0.07	
PO4	29.05	15.39	1.89	0.06	
O2	-4.46	3.25	-1.37	0.17	
PCoA1	4.12	0.34	12.01	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	5.64	0.42	13.52	<b>&lt;0.001</b>	
5 m					0.81
Intercept	8.71	4.75	1.83	0.07	
NP	-1.27	0.40	-3.20	<b>0.002</b>	
NB	5.33	1.49	3.57	<b>&lt;0.001</b>	
Salinity	0.21	0.15	1.42	0.16	
NH4	-32.80	23.29	-1.41	0.16	
NO2	10.34	4.71	2.20	<b>0.03</b>	
O2	0.47	0.30	1.58	0.12	
PCoA1	-2.81	0.29	-9.55	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	5.09	0.36	14.06	<b>&lt;0.001</b>	
10 m					0.84
Intercept	5.66	2.04	2.78	<b>0.007</b>	
NP	-1.79	0.72	-2.48	<b>0.02</b>	
NB	-1.68	1.02	-1.66	0.10	
MEM1	0.33	0.20	1.67	0.09	
Salinity	0.35	0.13	2.66	<b>0.009</b>	
TN	0.04	0.03	1.50	0.14	
TP	-3.03	1.83	-1.66	0.10	
NO2	32.64	16.65	1.96	0.06	
PCoA1	2.94	0.38	7.66	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	5.54	0.38	14.43	<b>&lt;0.001</b>	
15 m					0.79
Intercept	-5.48	2.60	-2.11	<b>0.03</b>	
NP	4.53	3.07	1.48	0.14	
Salinity	0.44	0.17	2.62	<b>0.01</b>	
TP	1.39	0.57	2.43	<b>0.02</b>	
NH4	2.30	1.49	1.54	0.13	
PO4	-5.64	1.50	-3.77	<b>&lt;0.001</b>	
O2	0.65	0.24	2.65	<b>0.009</b>	
PCoA1	-6.36	0.38	-16.55	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	2.18	0.39	5.62	<b>&lt;0.001</b>	
20 m					0.80
Intercept	22.70	4.81	4.72	<b>&lt;0.001</b>	
NP	-0.53	0.21	-2.48	<b>0.02</b>	
NB	2.31	0.64	3.60	<b>&lt;0.001</b>	
MEM1	-0.27	0.14	-2.01	<b>0.04</b>	
Salinity	-1.33	0.39	-3.44	<b>&lt;0.001</b>	
TP	2.32	1.18	1.96	0.06	
NH4	-4.94	1.44	-3.43	<b>&lt;0.001</b>	
O2	-1.39	0.33	-4.16	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA1	5.38	0.35	15.21	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	2.80	0.40	6.98	<b>&lt;0.001</b>	

30 m					0.73
Intercept	10.82	2.24	4.83	<b>&lt;0.001</b>	
NP	-1.01	0.26	-3.84	<b>&lt;0.001</b>	
NB	5.20	1.30	4.01	<b>&lt;0.001</b>	
Temperature	0.22	0.08	2.77	<b>0.007</b>	
Salinity	-0.24	0.11	-2.16	<b>0.03</b>	
PCoA1	3.50	0.48	7.35	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	4.29	0.64	6.69	<b>&lt;0.001</b>	

The table 13 summarized the model calculated in the Kattegat-Skagerrak at 0, 5, 10, 15, 20 and 30m-depth. The amount of variation explained by the models varied from 38% to 88%. The highest values were obtained at 30m-depth whereas the lowest were calculated at 20m-depth. At each sampled depth, the traits significantly and positively explained the total abundance of the PFGs. They were the best predictors. Then, niche parameters were strongly involved in the models. Niche position (NP and known also as marginality) was significantly involved in the models at 5, 10, 20 and 30m-depth. At 5 and 10m-depth NP positively contributed to the model whereas at 20 and 30m-depth, it negatively contributed to the models. Niche breadth (NB known also as tolerance) significantly structured the model at 5, 15 and 30m-depth. At 5 and 15m-depth, NB positively contributed to the models whereas NB negatively explained the abundance in the model at 30m-depth. Some environmental parameters were also significant. Temperature was the most recurrent. It was positively involved at 5, 10 and negatively at 30m-depth. No MEMs were involved in the models. In a general way, the way each variable (except traits) contributed to the abundance changed between the surface to 15m and 20 to 30m-depth.

Tableau 13 : Reduced generalized linear model based on the Akaike Information Criterion for each depth in the Kat area (Kattegat-Skagerrak).

	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>t</i>	<i>p-value</i>	<i>Adjusted D<sup>2</sup></i>
Surface					0.66
Intercept	7.12	2.53	2.82	<b>0.007</b>	
NP	-0.42	0.25	-1.72	0.09	
NB	-1.32	0.66	-2.01	0.05	
MEM1	0.17	0.10	1.78	0.08	
PCoA1	-3.30	0.52	-6.30	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	5.01	0.70	7.18	<b>&lt;0.001</b>	
5 m					0.74
Intercept	-3.17	1.58	-2.01	<b>0.04</b>	
NP	0.27	0.05	3.38	<b>0.002</b>	
NB	0.76	0.17	4.45	<b>&lt;0.001</b>	
Temperature	0.22	0.09	2.40	<b>0.02</b>	
PCoA1	2.73	0.40	6.86	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	3.92	0.44	8.81	<b>&lt;0.001</b>	
10 m					0.75
Intercept	-17.68	4.43	-4.00	<b>&lt;0.001</b>	
NP	1.14	0.28	4.13	<b>&lt;0.001</b>	
Temperature	0.93	0.35	2.63	<b>0.01</b>	
Salinity	0.04	0.02	1.59	0.12	
TN	-0.84	0.33	-2.53	<b>0.01</b>	
TP	9.74	3.68	2.65	<b>0.01</b>	
PCoA1	4.60	0.40	11.52	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	4.22	0.51	8.23	<b>&lt;0.001</b>	
15 m					0.78
Intercept	0.34	1.13	0.30	0.76	
NB	0.61	0.28	2.17	<b>0.03</b>	
Temperature	0.14	0.08	1.91	0.06	
PCoA2	6.02	0.42	14.45	<b>&lt;0.001</b>	
20 m					0.38
Intercept	-0.26	6.18	-0.04	0.97	
NP	-0.13	0.06	-2.33	<b>0.02</b>	
Salinity	0.09	0.14	0.64	0.52	
TP	3.01	3.91	0.77	0.44	
PCoA2	4.04	0.67	5.99	<b>&lt;0.001</b>	
30 m					0.88
Intercept	7.56	0.79	9.52	<b>&lt;0.001</b>	
NP	-0.05	0.02	-2.61	<b>0.01</b>	
NB	-0.29	0.05	-5.46	<b>&lt;0.001</b>	
Temperature	-0.13	0.03	-4.91	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA1	3.75	0.40	9.38	<b>&lt;0.001</b>	
PCoA2	4.36	0.37	11.81	<b>&lt;0.001</b>	

## 4. Discussion

### 4.1. Community composition in the horizontal and vertical gradient

Phytoplankton Functional Groups (PFG) were characterized according to their pulse shape-recording cytometry-defined optical properties, mainly their size and their fluorescence responses, as carried out in previous analysis with this technique (Rutten et al., 2005; Thyssen

et al., 2008b, 2008a). Nine PFGs were characterized from the continuous recording whereas ten PFGs were identified on the discrete samples collected at different depths. PicoORG, NanoLowORG, NanoHighORG and MicroORG have high phycoerythrin and/or phycoerythrin fluorescence. PicoORG may have represented *Synechococcus* spp. whereas MicroORG was identified as chains of cyanobacteria from images taken by the CytoSense (annex IX). NanoLowORG and NanoHighORG may be either small filamentous colonies of cyanobacteria or cryptophytes. Chroococcales single-cells or colonies of 1-3µm cells were also identified by microscopy and might be included in PicoORG, NanoLowORG, NanoHighORG and MicroORG groups, depending on the size of the cells. Nevertheless, MicroORG could be also inferred as filamentous cyanobacteria as *Dolichospermum* sp., *Aphanisomenon* sp. and *Nodularia spumigena* were observed by microscopy, as well as phycoerythrin containing dinoflagellates (*Dynophysis* spp., Zapata et al., 2012) which was observed in the Gulf of Finland, the eastern Baltic Sea and in the Skagerrak at A13 during the study. NanoSWS was also a well-defined PFG group. Previous molecular study found same observation of Coccolithophorids in the Kattegat as us (Hu et al., 2016). The strong light scattering occurred at great angles which are mainly associated to the coccolithes. Consequently, coccolithophorids composed this PFG. On the contrary to cyanobacteria, cryptophytes and coccolithophorids, the other cytometric groups are less easily taxonomically resolved as they did not define a single taxonomic group, and, to some extent, might also represent different ecological features. Previous molecular identification reported the presence of Chrysophyta and Chlorophyta algae, most likely in the nanophytoplankton (NanoLowFLR, NanoHighFLR). Microscopic identification evidenced *Uroglena* spp. in the eastern and western Baltic Sea and Chlorophyta algae, especially *Binuclearia lauterbornii* in the southern Baltic Sea, which is also congruent with previous reports (Hu et al., 2016). None of the picoeukaryotes could be identified during the cruise as we did not benefit of the technique for their identification but Hu et al. (2016) reported the



presence of the Chlorophyta *Ostreococcus*, *Micromonas* and *Bathycoccus* in the summer autotrophic picoeukaryotes in the southern Baltic Sea. MicroRED included autotrophic eukaryotes with a size larger than 20  $\mu\text{m}$  and were composed by dinoflagellates and diatoms as deduced from microscopy observation and automated image acquisition (annex IX). In the Kattegat and Skagerrak, dinoflagellates of the genus *Triplos* spp. and the diatom *Proboscia alata* were the most abundant taxa. *Chaetoceros* spp. were very abundant in the Baltic Sea. However, the complex shape of diatoms and dinoflagellates make them mostly optically indistinguishable from each other at the species level.

Sub-surface recording with the flow cytometer showed that the horizontal gradual change of salinity and temperature observed during the campaign is suitable for well-established phytoplankton communities without small scales patches for most PFGs. Indeed, both picoeukaryotes (PicoLowFLR and PicoHighFLR) and red-fluorescent nanoeukaryotes (NanoLowFLR and NanoHighFLR) presented a wide spatial distribution of high abundance in our study area (and showed well marked increasing and decreasing gradients). However, MicroRED exhibited high abundance but changes in abundance within small distances in the Eastern Baltic Sea. Such pattern is also observed for NanoHighORG with maximum values in a small reduced SW Baltic area. Coccolithophorids were only observed in discrete samples of the Kattegat and the Skagerrak in the water column but not from the sub-surface measurement. Such observation of the coccolithophorids was also reported by Hu et al. (2016). They attributed the absence of coccolithophorids in the Baltic Sea due to low levels of calcium carbonate which avoid the coccolithes formation (Tyrrell et al., 2008). The fact we did not record Coccolithophorids from the continuous sub-surface measurement but we did from the discrete samples is surprising. For these observations, we can avoid a bias due to the protocol of analysis because both continuous and discrete protocols were the same. We thought that coccolithophorids are too sensitive to the pumping system of the Aranda and rough flow may

have damaged the cells. Summer conditions of the entire area are suitable for the development of small eukaryotic phytoplankton with PicoLowFLR as freshwater dominant group and PicoHighFLR as marine dominant group. Furthermore, after the spring diatom blooms, the summer period was characterized by high water temperatures and low N:P ratios which are very favorable conditions for the establishment and the development of the cyanobacteria (Bianchi et al., 2000; Stal et al., 1999; Wasmund and Uhlig, 2003), from their smallest single state (PicoORG) to long filamentous colonies (MicroORG). The large horizontal distribution of PicoORG, NanoLowORG, NanoHighORG and MicroORG reports freshwater filamentous cyanobacteria (MicroORG) and single-cell and colonial picocyanobacteria (PicoORG) to bloom within a salinity range of 7 - 8 PSU (Wasmund, 1997) which are common values reported in the Baltic Proper and the Gulf of Finland and measured during our study. In the opposite, single cell picocyanobacteria (i.e. *Synechococcus* spp.) are halotolerant, so, ubiquitous to marine and freshwaters (Celepli et al., 2017). The observation of MicroRED in the Skagerrak was consistent with previous studies (Hu et al., 2016; Wasmund and Uhlig, 2003). However, in our study, both microscopy and flow cytometry evidence high abundance of MicroRED. Microscopy revealed the presence of *Chaetoceros* spp. bloom. in the Eastern Baltic Sea and some *Heterocapsa triquetra* in the Gulf of Finland. Such observation is consistent with long term monitoring (Hällfors et al., 2013).

Despite, no clear sub-mesoscale structure was observed for the horizontal dimensions (excepted for some groups), the vertical dimension was defined by small scale structuring of phytoplankton communities. Along the water column, phytoplankton communities were strongly, but not necessarily, dependent on the Mixed Layer Depth (MLD) and to a lesser extend to the euphotic layer depth. The MLD which was comprised between 10 to 15m-depth, the shallower MLD being observed in the Straits. During summer, these values were consistent with the work of Reissmann et al. (2009) who showed sometimes a shallower MLD in the

Danish Straits. The strong difference in vertical distribution argue a niche-separation of the PFGs along the water column (Eigemann et al., 2018; Hajdu et al., 2007). For example, within the filamentous cyanobacterial group (MicroORG) niche segregation explains the vertical distribution (Hajdu et al., 2007). Thermal and light (derived from the PAR of the CTD) niches are known to structuring the distribution from the surface to the deepest part of the surface layer of *Nodularia sp.*, *Synechococcus sp.*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp* (Eigemann et al., 2018; Olli and Seppälä, 2001). On the other hand, the detection of patches restricted to few meters vertically and several kilometers horizontally might be related to phytoplankton thin layer (McManus and Woodson, 2012; Sullivan et al., 2010). Even if phytoplankton thin layers were previously reported in the Baltic Sea (Klais et al., 2011; Lips and Lips, 2014; Ploug, 2008), further experiments at smaller vertical scales (every meters) than the present study could confirm this hypothesis. In addition, the use of the automated flow cytometry made it possible to characterize those layers within the size-spectrum and the chlorophyll *a* - phycoerythrin differentiation, supporting a “pigmentary-niche” segregation between the groups along the water column.

Both horizontal and vertical structures are influenced by hydrodynamics but also by active or passive movement of microalgae (Steele et al., 1993). While the vertical aggregation for some groups can be related to motility or buoyancy regulation, the large horizontal patches are possibly resulting of dispersal of phytoplankton groups (Steele et al., 1993). Our results showed that picoeukaryotes and nanoeukaryotes are more likely to form large patches than MicroRED. Such observation support the hypothesis that size is the key phytoplanktonic feature for dispersal (Finlay, 2002). In the vertical dimension, the aggregation is driven by the resources especially light and nutrients. Other external factors, such as turbulence and vertical stirring, and internal factors, such as buoyancy of the organisms, have to be considered despite they were not verified. Depending on their inquiry to light, organisms are photo-induced or

chemotaxically motile according to nutrients status or availability (Elder and Olsson, 1985; Willey and Waterbury, 1989). The same mechanism operates for nutrient acquisition. This ability to adjust the position in the water column is linked to the motility of the organisms or their buoyancy. For example, picoeukaryotes (PicoLowFLR and PicoHighFLR), dinoflagellates (MicroORG and MicroRED) and single cell picocyanobacteria (PicoORG) can swim (supposed up to 25 $\mu$ m/s, Brahmsha, 1996) to meet their resources whereas diatoms (MicroRED) and colonial forming cyanobacteria (PicoORG, NanoLowFLR, NanoHighFLR and MicroORG) use strategies to avoid sinking using gas vesicles for cyanobacteria (Walsby et al., 1997).

#### 4.2.Environmental subsets and spatial PFG characteristics

The whole area was subset into two sub-areas after a PCA was carried out on environmental parameters. The comparison of depths and environmental conditions in the two subsets (Baltic Sea versus the Straits) was possible according to a common origin of the OMI analysis (from the surface to 30m, Fig. 56). It showed a rather homogeneous environmental condition in the Baltic Proper and the Gulf of Finland whereas the water column in the Kattegat and Skagerrak was highly heterogeneous and different from the brackish water-influenced sites. During the cruise, the whole study area was marked by a summer thermal stratification in addition to a permanent haline stratification (Wasmund and Uhlig, 2003). In the Gulf of Finland and the Baltic Proper, the thermocline and the halocline were deep, below 30m depth (annex X, Kullenberg, 1981). In the opposite, the thermocline in the Kattegat and the Skagerrak was observed closer to the surface, at 10m depth and was observed to follow the euphotic zone depth which sink up to 30m-depth. Such pattern is mainly explained by the shallower water column and a stratification occurring closer to the surface (annex IX, Wesslander et al., 2017). In the whole study area, the spatial pattern of fluorescence in the water column rather followed the salinity spatial patterns ( $\rho = -0.59^{***}$ ) than temperature one's ( $\rho = 0.23^{***}$ ). The presence of a

shallow mixed layer depth (10 to 15m) is coincident with the summer surface warming of the Baltic Sea (Reissmann et al., 2009). Fluctuations of the depth of the euphotic zone were observed in the whole study area (Fig. 55). Fluctuations within each subset were mainly but not necessarily attributed to the sampling time during the day as well as the cloud cover. A deep euphotic zone was observed during the day or during sunny days whereas shallow euphotic zone was more likely to be observed during the night and the cloudy days. In addition, the euphotic zone depth was shallow (from 7m to 13m depth) in the Baltic Sea, Gulf of Finland and in the Kattegat whereas it was very deep (up to 30m depth) in the Skagerrak. Such results are partially consistent with a previous survey on the transparency of the North Sea and Baltic Sea (Aarup, 2002). Both studies found that a  $Z_e$  shallower in the Baltic Sea than in the Kattegat and Skagerrak but the values of the Baltic Sea were different (Aarup study: 19m, present study: 10 to 15m). We attribute this shallower euphotic zone depth to the cloudy weather which reduced the light quantity in the water column or to light attenuation due to high phytoplankton concentration (Lund-Hansen, 2004).

In the Kattegat and Skagerrak, the environmental conditions at the surface and 5m-depth are likely to share commonness environmental conditions of the Baltic Proper and the Gulf of Finland (Fig. 56). Such observation means that the Sound area of the Kattegat subset presented environmental conditions closer to the Baltic Sea conditions than the rest of the Kattegat-Skagerrak area. Indeed, surface and 5m-depth samples of Landskrona station (located in the Sound) are responsible of this observation in our results (annex X). This strait represents a narrow region of exchanges between the Baltic Sea and the Kattegat. The circulation is characterized by shallow depth, reducing the stratification to few meters (Nordberg, 1991).

In the present study, we found a spatial heterogeneity of the niche position of the PFGs. Marginality (or niche position) is defined as the distance between the mean habitat conditions (the pool environmental conditions) used by the functional unit and the mean habitat conditions

over the entire studied area. In the Baltic Sea/Gulf of Finland, the lowest values of marginality were found at 15 m depth whereas they were the lowest at 5m in the Kattegat/Skagerrak. Marginality was strongly related to the MLD rather than to the euphotic zone depth. This is in agreement with findings in open ocean (Brun et al., 2015; Irwin and Finkel, 2017). The MLD is most likely to influence the spatial heterogeneity between the niches of the PFGs in the horizontal dimensions as well as along the water column. This was identified by an upwelling of the MLD and a sinking of the bottom of the euphotic zone going from the Kattegat to the Skagerrak (Fig. 55), MLD upwelling from 12.4 m-depth in the Baltic Sea to 6.7 to 7.5m-depth in the Kattegat and Skagerrak whereas  $Z_e$  sinking down 28.2m-depth. Finally, the MLD drives differences in physico-chemical conditions in each area, especially nutrient concentration and availability to phytoplankton, as we corroborate the largest environmental space at a given depth with the MLD. Despite, we found MLD as an important driver of the niche spatialization, we could not include it into our analysis as it represents a single value per station and our analysis needed one value per sampling depth per station. Showing the importance of the nutrients in the PFGs niche, the PFGs of the Baltic Sea and the Skagerrak-Kattegat respond to coastal environmental conditions like other coastal areas under freshwater influence (chapter 4, Louchart et al, *in prep*) unlike open ocean functional groups, in which nutrients would be the less important variables (Irwin et al., 2012).

On another hand, the PFGs characterized here exhibited a high residual tolerance revealing that the spatiotemporal variability was not only explained by the set of environmental variables considered for the analysis. Several previous studies found also large variability in the residual tolerance and our results were in their range which are comprised between 15% and 94% for diatoms communities (Heino and Soininen, 2006; Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018) and on the whole phytoplankton community described as PFGs in the Eastern English Channel and the North Sea (chapter 4 of this thesis). This high degree of residual

tolerance proves that the vertical distribution of the PFGs are not only driven by physico-chemical parameters. Indeed, we have to be aware that biological parameters such as intrinsic factors of each PFG (traits) or extrinsic factors (interactions with the others groups or other trophic levels) should be considered in the establishment of the niches. Not to consider them may lead to under-estimate (positive biological interaction) or over-estimate (negative biological interaction) the response of the PFGs (Hernández Fariñas et al., 2015). It might be interesting to consider these interactions on PFGs in the future for niche analysis especially because predation pressure is positively related to the MLD (Behrenfeld, 2010). Despite these considerations to improve the niche modelling, the residual tolerance obtained in our study was significant, meaning that the set of variables used here was pertinent in the niche definition.

Residual tolerance was lower than those of previous studies considering the species level (Heino and Soininen, 2006; Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018) and in agreement with the other study on the PFGs (Louchart et al., *in prep*). We can state that the niche of our PFGs were kindly better resolved than in previous studies. We justify this lower residual tolerance by two coincident explanations: (i) the set of variables used here are structural variables for phytoplankton distribution and (ii) grouping the species according to similar morphologies and physiology in similar functional groups decrease the ecological redundancy which explain better ecosystem functioning (Fontana et al., 2018; Reynolds et al., 2002). Indeed, as we observed in our results, it has already been reported that a classification based on functional groups detects more statistical variation than previous analysis based on species (Fabbro and Duivenvoorden, 2000; Kruk, 2002).

#### 4.3. Community model

The multiple explanatory variable's approach is powerful to bring to light the best predictors of a model responses. In our study, we investigate the importance of traits, spatial predictors, niche parameters and environmental variables in phytoplankton distribution and abundance. Up to

our knowledge, only few studies has done this previously and concerned mainly macroinvertebrates (Heino and de Mendoza, 2016; Heino and Grönroos, 2014; Heino and Tolonen, 2018), bromeliaceae (Marino et al., 2020), macrophytes (Alahuhta et al., 2017) or only diatoms in the phytoplankton groups (Rocha et al., 2018). In our study, the models explained from 66% to 88% of the abundance distribution of the PFGs, by using environmental parameters, spatial predictors, niche characteristics of each PFG and their associated traits. The community model showed that traits were the most important criteria in the abundance prediction's models based on PFGs, followed by niche parameters and, finally, by environmental variables. In other words, our results show that the variability in the traits' expression (i.e. changes in morphology, physiology...) within a functional group influenced strongly the PFG abundance variation between sites and depth than niche parameters of the group or any environmental conditions. Although the previous studies mentioned above showed that niche parameters were more important than traits in explaining abundance distribution, Heino and Grönroos (2014) and Heino and Tolonen (2018) previously reported that abundance varies stochastically in the niche model. They speculate that niche parameters could not better explain abundance than biological traits of species. They suggest that the traits selected in their studies did not represent structural traits in phytoplankton communities. However, it has been shown that traits outperformed niche parameters in previous work on macroinvertebrates (Verberk et al., 2010).

In microbial ecology, some traits are quite easily characterized but most of them are hard to estimate from *in situ* analysis and remains mainly estimated from experimental analysis (e.g. nutrient use traits, growth rates, Breton et al., 2017). Since a decade now, the CytoSense automated pulse shape-recording flow cytometers (PSFCM) have demonstrated their ability in characterizing morphological and physiological traits from the optical signatures of the particles (Fontana et al., 2019, 2018, 2016, 2014; Fragoso et al., 2019; Louchart et al., 2020; Pomati et



al., 2013, 2011). On each optical signal (FWS, SWS, FLR, FLO), it is possible to calculate mathematical features (length, area under the curve, asymmetry of the signal) giving a correspondence to functional traits. Thus, initially we define Phytoplankton Optical Groups (POGs) but as their optical signature is referred to traits, we proposed to label them as Phytoplankton Functional Groups (PFGs). Amongst the bunch of traits calculated, size, volume and shape represent “key-traits” (Finkel et al., 2010; Litchman and Klausmeier, 2008; Marañón, 2015) and many other traits are related because they are allometric-dependent (Edwards et al., 2012). For this reason, “key-traits” determine the rate of reproduction, mortality and movement (Fox, 2012) and thus affect the fitness of the organisms (Litchman and Klausmeier, 2008). Nevertheless, even if phenotypic traits are important, some physiological traits would also play a significant role in the distribution of microbial organisms as previously reported (e.g. Litchman et al., 2012; Pomati and Nizzetto, 2013). They mainly depend on features that are subjected to space and/or temporal variations. Such traits, that can be defined by flow cytometry, are related to pigment composition and their arrangement within the cells, being always dependent of the “master’s traits” or influencing them. They are characterized as “biomass size spectra” (see the review of Weithoff and Beisner, 2019) and lead to spectral differentiation of phytoplankton species forming phytoplankton spectral groups. Therefore, in response to light quality and quantity, distribution, thus abundance of spectral groups, would be physiologically-specific along the water column (Beisner and Longhi, 2013; Cullen and MacIntyre, 1998; Reynolds, 1984).

Although, several studies as well as our findings support a biology-abundance dependence and not an environment-abundance dependence (Pomati et al., 2011), environmental variables exert a pressure on the biology of each functional group. The environment does not directly influence the abundance but rather filters the traits selecting the most adequate one (Cornwell and Ackerly, 2009; Kraft et al., 2008; Kraft and Ackerly, 2010). This remark is linked to the Baas-

Becking's hypothesis in which "everything is everywhere but the environment selects". In this case, the traits variations within a phytoplankton functional group reflect the response to environment variations. Therefore, the abundance of the organisms results of the adaptedness of the organisms to their habitat according to their ecological niche (Fox, 2012; Weithoff and Beisner, 2019). Furthermore, environmental variation leads to the formation of gradients of resources. Such gradients induce a response of phytoplankton traits to optimize their performance (Nutrient Use Efficiency which is the biomass per unit of nitrogen available, Breton et al., 2017; Resource Use Efficiency<sub>chl<sub>a</sub></sub> and Resource Use Efficiency<sub>pp</sub> which are biomass proxy or primary production related to the amount of potentially limiting resource, Lehtinen et al., 2017). Consequently, in a pool of species, the optimization of a given trait to acquire the resources will lead to traits overlap between phytoplankton functional groups (Edwards et al., 2012). Thus, the traits optimization will also increase niche overlap between the PFGs (Louchart et al., *in prep*). Finally, in addition to traits, niche parameters (habitat conditions through niche breadth and niche position) would also be related to abundance variability.

Our findings report also the importance of niche position and niche breadth in defining abundance distribution models. Although this finding is important, niche parameters were not always significant in our models and still remain less important than traits. From the two niche parameters calculated, niche position (NP) override niche breadth (NB) for modelling abundance distribution. This observation was also reported in one of the few studies existing, concerning only freshwater diatoms and based on taxonomy (Rocha et al., 2018). Thus, we provide the first results considering brackish and marine phytoplankton groups and taking into account the whole community. NP was negatively correlated with abundance. This means that the less a PFG is marginal, the more it will be abundant in common habitats and *vice versa*. The fact that most of the groups were generalist is due to the low taxonomical and possible not deep

enough functional resolution. According to the definition of a PFG which is a pool of species sharing similar functional (in this case, optical) properties, the niche of the PFG is the environmental space defined by the extreme environmental values at which this pool of species occurred. As species do not have the same occurrence at the extreme values considered, some species niches can be smaller than another one. Consequently, the niche of the PFG is larger than the niche of a species, even though it could very well concern a group of different species (taxonomically different but ecologically redundant; Machado et al., 2015). In the opposite, the only PFG defined as a specialist in our study, NanoSWS (i.e. Coccolithophorids), is well both taxonomically and functionally characterized and observed only in the Kattegat and Skagerrak. As it is not encountered in low salinity waters, where also the nutrient concentration was higher, its niche was strongly reduced compared to the other PFGs qualifying this PFG as specialist. On the other hand, NB was positively correlated with the abundance. In this case, the more a PFG is tolerant to the environment (i.e. high NB values), the most it is able to outburst and, consequently, accumulate with high abundance.

Space was not significantly involved in the models explaining distribution of PFGs. Thus, no influence of the spatial predictors (i.e. *db-MEM*) were observed on the PFG distribution from discrete stations. This result evidences that spatial mechanisms regulating plankton between the discrete stations, such as dispersal by advection, were not evidenced in our study. Thus, our findings head for no structure at the large mesoscale (>100 km) and regional scale (>1000 km). In fact, such results were expected as critical patches size in the Baltic Sea and the Kattegat (Astheimer, 1983; Olsson and Edler, 1991) were smaller than the minimal distance between pairs of stations (A13 to Släggo: 26 km). This suggests patchiness at scale smaller than the closest pair of discrete stations thus, heading for sub-mesoscale (1 - 10 km) or small mesoscale (10 to 25km) structures. At such large mesoscale and regional scale, dispersal is very scarce. For this reason, pairs of closed stations or distant ones sampled within our study were strictly

independent from each other. Furthermore, the results presented in the section “Community composition in the horizontal and vertical gradient” addressed small mesoscale (<100 km) and sub-mesoscale (< 10 km) structure in phytoplankton functional group distribution as found in other temperate marginal seas as the English Channel (Louchart et al., 2020), and as already observed in the Baltic Sea (Lips et al., 2011). In the horizontal dimension, the large patches of phytoplankton suggest that dispersion plays a larger role in explaining and defining phytoplankton distribution at the sub-mesoscale than at regional or broader scales (Wiens, 1989). In this study, we could not process the analysis at the sub-mesoscale because nutrients (structuring variables in phytoplankton distribution) were not analyzed at that scale (no automated nutrient analysis was performed). Therefore, we suggest that the models should be revisited to investigate small scale processes. We suggest for this, further investigation of spatial monitoring at local scale such offshore-inshore transects in different areas. Finally, phytoplankton might be impacted by lower and higher trophic levels. Those interactions might be positive (mutualism or commensalism) or negative (infections or predation). In this frame, it would be interesting to add other planktonic compartment (bacteria, virus, parasites, zooplankton) to investigate how they interact with phytoplankton in their abundance modelling. This step should be integrated with the traits and niche parameters as well, to determine any traits or niches shifts under these pressures or benefits.

## **5. Conclusion**

The present study reported, for the first time, the spatial distribution of marine phytoplankton assessed at horizontal sub-mesoscale and vertical small scale, by modelling niche parameters, traits, environment and spatial descriptors together. The variability of the abundance of the whole size range of marine phytoplankton could be explained by the traits’ variation of the phytoplankton functional groups characterized by automated pulse shape-recording flow cytometry. Niche parameters (niche position and niche breadth) were also involved in PFGs

distribution. No dispersal mechanisms occurred at our sampling scale. On the contrary of most previous studies on those matters, dealing mainly with taxonomic approaches, we considered, instead, phytoplankton functional diversity from optical properties. Results may change considerably using taxonomical diversity because some species can share the same niche than others (plankton paradox of Hutchinson) leading to ecological redundancy as well as similar traits which lead to functional redundancy. Further studies should combine both approaches and should also consider fine scale monitoring of phytoplankton and more relevant environmental variables, to investigate better the dispersal mechanism as phytoplankton is structured at the sub-mesoscale. The method presented here gives the ability to predict phytoplankton abundance in a gradient of resources according to their traits and their niches parameters. Shifting in resources induce changes in phytoplankton communities. In the case of phytoplankton blooms, the use of niche parameters and trait shifts as well as the resources available could help predicting the amplitude of blooms and possibly the spatial extent of those blooms, helping environmental managers regarding environmental sea policy as European Water and Marine Strategy Framework Directives (WFD, MSFD).

### **Acknowledgments**

AL was co-funded by a PhD grant from the “Université du Littoral - Côte d’Opale” and co-funded by a “Hauts-de-France” Regional research fellowship. He is currently funded by a research fellowship grant of PON PLaCE ARS01\_00891 of the Stazione Zoologica Anton Dohrn. The “Aranda” cruise was part of the Swedish current monitoring of the Baltic Sea coordinated by SMHI and benefited for this present work of the support of the JERICO-NEXT project. The JERICO-NEXT project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 654410. We thank the

Captain and the crew of the research vessel “Aranda” as well as the scientific and technical staff of the different institutes involved.



## Chapitre VI : Discussions/Perspectives

L'importance d'étudier le phytoplancton marin n'est plus à démontrer. Ce groupe polyphylétique de microorganismes procaryotes et eucaryotes joue de multiples rôles écologiques indispensables au fonctionnement des écosystèmes et de la biosphère : implication dans de nombreux cycles biogéochimiques, position à la base de la plupart des réseaux trophiques pélagiques mais également benthiques, régulateur du climat. Ces aspects, couplés au cycle de vie pouvant être rapide et en réponse aux gradients environnementaux, acquérant une relevance toute particulière si on considère les espèces nuisibles ou toxiques pour l'environnement, les autres organismes et la santé publique, font qu'il devient nécessaire d'adapter la fréquence d'échantillonnage face aux variations environnementales pour rendre compte, comprendre et prédire, si possible, les changements dans la composition des communautés ainsi que les interactions multiples avec les différentes pressions et les autres niveaux trophiques.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont eu pour but d'étudier la dynamique du phytoplancton dans des écosystèmes marins côtiers, dans des conditions environnementales intrinsèques ou saisonnières diversifiées, tant au niveau des paramètres abiotiques que des paramètres biotiques. Ces écosystèmes étudiés ont été 1) la Manche occidentale et Manche centrale lors de la transition été-automne, présentant des gradients de température et salinité définissant des systèmes frontaux tidaux et halins influençant l'accumulation et la dispersion du phytoplancton (chapitre 3), 2) la Manche orientale et sud de la Mer du Nord au milieu du printemps dans les conditions de développement des efflorescences printanières de diatomées et *Phaeocystis globosa* (chapitre 4), puis, 3) la Mer Baltique, les détroits du Kattegat et Skagerrak en période estivale, caractérisés par un large gradient de salinité et des efflorescences



de cyanobactéries filamenteuses et dinoflagellés (chapitre 5). Cette approche a mis en exergue la dynamique à petites échelles spatiales et temporelles de l'ensemble du spectre de taille du phytoplancton, et permis d'étudier leurs niches écologiques et leurs traits fonctionnels dérivés de leurs propriétés optiques, en relation avec l'environnement. Point commun aux chapitres 3, 4 et 5, l'approche horizontale à petite échelle a pu être réalisée en combinant une vitesse des navires variant de 5 à 12 nœuds et un temps d'analyse au cytomètre en flux de 10 minutes. Ces caractéristiques font que l'échelle d'analyse sur la dimension horizontale est comprise entre 1,54 et 3,70 kilomètres ce qui classe ces analyses à la sub-mésoéchelle. De même, il a été possible d'explorer et d'étudier, dans des écosystèmes fortement stratifiés de façon permanente et saisonnière de la Mer Baltique et détroits du Kattegat et Skagerrak, la dimension verticale à petite échelle de la variabilité de la distribution des PFGs. Cette stratégie s'est basée sur un échantillonnage à 6 profondeurs (de 0 à 30 m) sur 18 stations.

Ce chapitre de discussion générale reprend les objectifs définis dans l'introduction, expose les résultats obtenus et en fait une critique appuyée sur la littérature. Enfin, des perspectives d'améliorations et d'études sont proposées au fil de la discussion des résultats.

### **Amélioration pour le traitement des données à haute fréquence.**

Cette thèse s'inscrit dans la continuité du projet DYMAPHY via le CPER MARCO et le projet H2020 JERICO-NEXT, visant à promouvoir le déploiement et l'amélioration des capteurs disponibles et nécessaires à l'observation du milieu marin en zone côtière. Lors du projet DYMAPHY<sup>11</sup>, des travaux sont initiés sur la comparaison entre les configurations des cytomètres automatisés disponibles. Les comparaisons se sont concentrées sur l'analyse de billes servant à la calibration ainsi que sur des cultures. Les résultats avaient alors permis de

---

<sup>11</sup> <http://www.dymaphy.eu/>

mettre en évidence de bonnes correspondances entre les différentes configurations des cytomètres. Au cours du chapitre 2 de cette thèse, nous avons réalisé une intercomparaison entre les protocoles d'analyses et les configurations des disponibles entre trois cytomètres automatisés pendant la campagne du VLIZ 2017. La réalisation de cette intercomparaison a montré que les différentes configurations ainsi que les protocoles appliqués pouvaient avoir une légère influence dans la détection de certains groupes (Pico-Synecho et Nano-Crypto). Les différences sont expliquées par les seuils de détection ainsi que par le nombre de lasers et leur bande d'excitation. Néanmoins, la bonne reproductibilité dans la détection des groupes fonctionnels phytoplanctoniques montre la fiabilité des cytomètres automatisés, quelque soit leur configuration à caractériser les communautés phytoplanctoniques. Ce type de résultats est particulièrement nécessaire pour valider l'interopérabilité des capteurs dans le cas de la mise en place de réseaux d'observations par exemple.

Un deuxième aspect traité dans ce chapitre matériels et méthodes relève du contrôle qualité. Cette thèse propose un contrôle qualité sur les données lors de l'acquisition (alignement du laser, du cœur) mais également lors du traitement des données, en amont des analyses statistiques. Il a été suggéré que les particules ayant une longueur de Foward Scatter et/ou de Sideward Scatter égale à  $0,2 \mu\text{m}$  soit supprimées des analyses puisqu'elles correspondent à la limite de détection du cytomètre. Un second contrôle est à appliquer sur les abondances en fonction du volume analysé. Cette représentation permet d'identifier les potentiels échantillons suspects. La mesure est affinée en calculant la distance de Cook révélant les échantillons significativement différents de la courbe des abondances en fonction du volume. Une visualisation sur le logiciel de gating est alors nécessaire pour confirmer ou non le résultat du test de Cook. Enfin un troisième contrôle qualité est réalisé sur la taille et est repris de Bonato et al. (2015). La mise en place d'un contrôle qualité commun à tous les utilisateurs est une nécessité pour l'interopérabilité des capteurs et la validité des résultats. Des discussions doivent

avoir lieu dans ce sens dans le projet JERICO-S3. La création d'une boîte d'outils libre de droit sous forme d'une liste de contrôles qualité à faire représenterait une avancée allant dans le sens d'une meilleure validité pour ensuite alimenter les bases de données.

Une seconde intercomparaison concerne les méthodes de gating ainsi que la classification automatisée par apprentissage machine via l'algorithme « random forest ». Bien que les résultats soient fortement similaires, cette intercomparaison a permis de mettre en évidence que le gating était dépendant de l'opérateur, les résultats obtenus par les pourcentages de zones communes en étant le reflet (32 à 68% de zones communes aux différents opérateurs et classification automatisée). La classification automatisée a alors été testée pour connaître la correspondance de la classification semi-supervisée sur des données acquises à haute fréquence pendant une campagne océanographique vis-à-vis des données clusterisées manuellement. Les résultats ont montré une bonne fidélité globalement pour tous les groupes fonctionnels phytoplanctoniques caractérisés, que ce soit en termes d'abondance ou de fluorescence rouge (biomasse chlorophyllienne), sauf pour les picoeucaryotes et le microphytoplancton. Ces groupes ressortent comme les plus variables car les picoeucaryotes peuvent posséder une faible fluorescence rouge amenant la classification automatisée à les confondre avec du bruit mécanique. Enfin, le microphytoplancton est le groupe le plus faiblement représenté possédant une grande diversité de profils optiques complexifiant l'obtention d'un prototype. Plusieurs pistes peuvent permettre de diminuer ces divergences. Elles consistent à accroître la diversité de profils optiques servant de prototypes dans le microphytoplancton afin d'accroître leur reconnaissance. Il faut également que les prototypes soient issus de la même zone échantillonnée, de la même période au cours de l'année, avec des paramètres d'acquisition identiques (canal du seuil de détection, intensité du seuil de détection). D'après l'intercomparaison sur les trois cytomètres, nous pourrions supposer que la création de prototypes à partir d'acquisitions faites avec un autre cytomètre ne devrait pas poser de

problème puisqu'ils semblent interoperables. Néanmoins, cette hypothèse reste à valider et peut faire l'objet de nouvelles investigations dans le cadre du nouveau projet JERICO-S3. Toutefois, la clusterisation semi-supervisée semble être un outil puissant pour la classification puisqu'elle permet de traiter de manière non objective et rapidement (quelques dizaines de minutes) les données d'une campagne par rapport au gating manuel. Ce type de classification s'avère être un atout avec l'augmentation de la quantité de données.

### **Quels mécanismes façonnent la distribution spatiale en eaux de sub-surface du phytoplancton en Manche occidentale et en Manche centrale ?**

La campagne halieutique CAMANOC de 2014 se déroulant en Manche occidentale et Manche centrale, a permis le déploiement d'un cytomètre en flux automatisé pour la première fois sur l'ensemble de la zone, alors qu'un appareil avait auparavant été installé dans le système FerryBox sur la ligne de ferry Roscoff-Plymouth (Marrec et al., 2013).

Au cours de la campagne CAMANOC, le navire océanographique *Thalassa* a traversé différentes masses d'eaux identifiées sur la base de critères abiotiques essentiellement. Ainsi, les données environnementales (température, salinité) acquises via un thermo-salinomètre ont mis en évidence le front d'Ouessant à haute résolution spatiale. Le couplage avec le cytomètre montre que la plupart des groupes phytoplanctoniques caractérisés forment des maxima d'abondances de part et d'autre du front d'Ouessant où certains groupes s'excluent spatialement le long de ce front formant ainsi une succession de patches de fortes et de faibles abondances. Les résultats observés montrent alors que le front agit comme une zone d'agrégation très productive avec une structure à sub-mésoséchelle déjà observée pour d'autres zones frontales avec ou sans upwelling : Kuroshio (Clayton et al., 2014), partie du front d'Ouessant en Mer d'Iroise (Landeira et al., 2014), front du plateau continental Argentin (d'Ovidio et al., 2010). La mise en évidence de structures à sub-mésoséchelle chez le phytoplancton via des mesures *in vivo* à haute fréquence concorde avec la détection de fluorescence par mesures satellitaires

(d'Ovidio et al., 2010; Łysiak-Pastuszak et al., 2012) ou de fluorimètres *in vivo* déployés sur le terrain (Karlson et al., 2016; Petersen, 2014; Seppälä et al., 2007), par l'imagerie *in vivo* (Anglès et al., 2015; Picheral et al., 2010) ou vidéo (Landeira et al., 2014), ainsi que par des mesures de paramètres photosynthétiques ou productivité via la fluorimétrie de type « Fast Repetition Rate fluorescence-FRRf » (Aardema et al., 2019; Houliez et al., 2017) ou encore de cytométrie en flux automatisée (Marrec et al., 2018; Swalwell et al., 2011; Thyssen et al., 2009) dont certaines en Manche occidentale et orientale (Bonato et al., 2015; Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013). De nombreux travaux mettent en évidence l'utilisation de la cytométrie en flux automatisée pour caractériser les communautés phytoplanctoniques en Manche et Mer du Nord à différentes périodes de l'année, notamment lors de campagnes antérieures à cette thèse (Projet INTERREG IV A « 2 Mers » DYMAPHY - campagne DYPHYMA, Bonato et al., 2015 ; DYPHYMA-PROTOOL, Thyssen et al., 2015), ou étudiées dans cette thèse (CAMANOC et le suivi PHYCO-VLIZ-RWS) ainsi que des études menées parallèlement à celle-ci (ECOPEL printemps et été 2018, CGFS 2018 et IBTS 2019, dans le cadre de la convention MTES-CNRS pour la mise en place de la DCSMM dans les Habitats Pélagiques). A cela s'ajoute les suivis réguliers réalisés par l'IFREMER (Manche-Mer du Nord) le VLIZ (Manche Orientale-Mer du Nord) et le RWS (Mer du Nord) et le suivi côtier du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences sur la radiale de la baie Saint Jean-Slack-campagnes DHYPHYRAD (Bonato et al., 2016; Breton et al., 2017; Guiselin, 2010). L'étude présentée dans le chapitre 3 vient ainsi compléter l'approche à sub-mésoséchelle par cytométrie en flux automatisée en Atlantique nord-est après des études déjà réalisées au printemps en Manche orientale (Bonato et al., 2015) et en Mer du Nord (Thyssen et al., 2015).

Dans notre étude, les paramètres physiques sont le moteur de la distribution du phytoplancton à petite échelle en Manche occidentale et centrale au cours de la transition été-automne, notamment avec le front d'Ouessant et les courants de marée. Néanmoins, bien que le front

permette d'expliquer la structuration des communautés phytoplanctoniques, il n'en demeure pas moins qu'une part non négligeable de cette structuration est expliquée par d'autres facteurs non pris en compte. En effet, si ces zones sont fortement productives, c'est à la fois grâce au contrôle « bottom-up » et grâce au contrôle « top-down » (Clayton et al., 2014) exercés sur le phytoplancton. Les sels nutritifs ainsi que la prédation seraient donc des antagonistes ou des agonistes à la structuration spatiale du phytoplancton. Ainsi, l'ajout de ces composantes dans notre modèle pourrait accroître la contribution de l'environnement (*sensu lato*) dans le partitionnement de la variance. Néanmoins, actuellement, la mesure automatisée à haute fréquence des sels nutritifs n'est pas implémentée sur les navires océanographiques, soulevant la question de la pertinence d'une mesure des sels nutritifs sur une emprise spatiale aussi large, à haute résolution temporelle et sans réplification spatiale. Des progrès sont toutefois réalisés sur ces points. Le gain en résolution (spatiale ou temporelle) passe par le déploiement *in situ* de capteurs capables d'analyser plus rapidement, capables de faire une mesure directe via des mesures optiques ou en utilisant des stocks de réactifs pour une mesure indirecte rapide. Ce déploiement a par exemple eu lieu sur des plateformes fixes de l'IFREMER avec de bons résultats lors de comparaisons avec les protocoles traditionnels (Vuillemin et al., 2009). Toutefois, les mesures en continu des nutriments sont très difficiles à obtenir en milieu marin pour différentes raisons et des groupes de travail se sont focalisés et se focalisent toujours sur ces problématiques (AtlantOS<sup>12</sup>, projets JERICO<sup>13</sup> ; Daniel et al., 2020).

A la différence de Landeira et al. (2014), notre étude du front d'Ouessant s'est uniquement focalisée sur les 2 dimensions horizontales ce qui ne nous a pas permis de mettre en évidence la structure verticale des communautés phytoplanctoniques qui est pourtant très hétérogène dans la colonne d'eau dans la zone stratifiée (Holligan et al., 1984). La plupart des études se

---

<sup>12</sup> <https://www.atlantos-h2020.eu/>

<sup>13</sup> <https://www.jerico-ri.eu/>

focalisant sur la distribution verticale en Manche centrale et Manche occidentale, l'ont été au travers du front, et les études de la position du front au centre dans les eaux du large de la Manche (Garcia-soto et al., 1995; Garcia-Soto and Pingree, 2009; Pingree et al., 1978; Pingree and Griffiths, 1978). Enfin, Ménesguen and Gohin (2006) ont montré que le front était une structure dynamique dans le temps, disparaissant en hiver pour réapparaître au printemps et s'enfoncer progressivement dans la Manche occidentale jusqu'en été avant de régresser vers l'ouest et à l'entrée de la Manche en automne. Il conviendrait alors de répliquer cette étude dans le temps et de caractériser les communautés phytoplanctoniques à l'échelle des saisons et aussi inter-annuellement en rapport avec la dynamique de ce front. Cette stratégie d'échantillonnage a d'ailleurs fait l'objet d'un stage de master 1 (Dédécker, 2018) poursuivi en master 2 (Dédécker, 2019) via les campagnes ECOPEL Manche leg1 (printemps 2018) et leg 2 (été 2018) CGFS 2018 (automne) et IBTS 2019 (hiver) se déroulant en Manche. Néanmoins, le front d'Ouessant n'a pas pu être identifié en 2018 probablement en raison de la grille d'échantillonnage des campagnes ECOPEL Manche 2018 Leg 2 et CGFS 2018.

Au cours de la présente étude, la caractérisation de masses d'eaux et des communautés phytoplanctoniques sur la base des abondances et de la fluorescence rouge (i.e. proxy de biomasse chlorophyllienne) se superposent relativement bien. Ces observations vont ainsi dans le même sens qu'une étude en milieu ouvert et stratifié dans l'océan Atlantique nord est, entre les Açores et Brest (France, Thyssen et al., 2009) mais différent d'études côtières réalisées en Manche orientale. Dans ces études, la colonne d'eau est continuellement bien mélangée (Bonato et al., 2015) corroborant ainsi d'avantage l'hypothèse que dans des masses d'eaux stables car stratifiées, les communautés phytoplanctoniques de sub-surface sont corrélées à l'état hydrologique de ces masses d'eau alors que dans les masses d'eaux continuellement mélangées, elles ne le sont pas. Néanmoins, le partitionnement de variance utilisant les données à haute résolution spatio-temporelle montre que les données hydrologiques disponibles mesurées avec

un pas égal ou supérieur à celui de la cytométrie ne sont résolument pas les seules à expliquer la structuration des communautés phytoplanctoniques par les masses d'eaux. Comme énoncé précédemment, la prise en compte d'autres processus chimiques (acquisition de nutriments), biologiques (broutage, parasitisme eucaryote ou viral) et hydrodynamiques-physiques (courantologie, turbulence, etc.) devrait avoir un impact sur la structuration des communautés phytoplanctoniques dans la zone et, bien que complexifiant les analyses et les interprétations, ne ferait qu'améliorer la perception réelle des mécanismes impliqués dans la structuration des communautés. En outre, la définition des communautés est le résultat entre la combinaison de deux matrices : l'une sur les abondances et l'autre sur la biomasse chlorophyllienne en émettant le postulat que la fluorescence rouge est un proxy de la biomasse chlorophyllienne. Dans le cadre de cette étude, le postulat est celui que la relation entre la fluorescence rouge et la biomasse chlorophyllienne est linéaire. Or, ce n'est pas le cas car la relation entre fluorescence rouge et chlorophylle *a* est plutôt de type curvilinéaire (Álvarez et al., 2017). Deux phénomènes peuvent expliquer ceci : l'état physiologique des cellules qui peut être différent selon les conditions (e.g. stress) sans affecter la concentration en chlorophylle *a* et l'effet de la taille sur le contenu en chlorophylle *a* par unité de volume connu sous l'effet « package effect » (Finkel et al., 2010; Marañón, 2015). Toutefois, les expérimentations réalisées par Haraguchi et al. (2017) montrent qu'il est possible d'obtenir pour la cytométrie en flux de type « pulse shape-recording » une relation entre la mesure de fluorescence chlorophyllienne et la biomasse chlorophyllienne à partir de mesure *in situ* des communautés, tout en incluant les réponses physiologiques différentes des cellules. L'application de ces relations entre biomasse chlorophyllienne et fluorescence rouge du cytomètre proposées par Haraguchi et al. (2017) nécessite d'être réalisée à chaque site d'étude et en fonction de la période de l'année considérée, mais l'obtention de ces relations s'avère nécessaire dans le cas d'étude sur les traits physiologiques si ceux-ci sont exprimés en contenu pigmentaire et non pas en fluorescence,



tout comme le calcul de biomasse carbonée en fonction de Forward Scatter pour estimer la production primaire via la cytométrie.

L'étude en Manche occidentale et Manche centrale montre également qu'il y a une variabilité inter-groupes et intra-groupes des traits cytométriques entre les différentes masses d'eaux. La variabilité inter-groupes est principalement due à des différences dans la composition interne et externe des particules : une taille différente pour un cortège de fluorescence similaire (*Synechococcus*/PicoORG vs Cryptophytes), des ratios pigmentaires différents (*Synechococcus* vs picoeucaryotes autotrophes) ou la présence/absence de plaques calcaires (Coccolithophores). Cette variabilité inter-groupe est même le principe fondamental sur lequel repose la caractérisation des groupes fonctionnels en cytométrie en flux. En revanche, la diversité intra-groupes est moins évidente. Comme dans d'autres études *in situ*, les variabilités inter et intra-groupes sont le reflet de gradients environnementaux (Des Roches et al., 2018; Pomati et al., 2013). Ainsi les gradients environnementaux étant intimement liés à l'espace et au temps, les valeurs de traits vont varier en fonction des échelles spatiales (Roselli et al., 2017). Néanmoins, les résultats présentés dans le chapitre 3 ont montré que ce n'était pas systématique, la variabilité intra-groupe ne répondant qu'à quelques paramètres. La plasticité des traits peut alors être présentée comme mécanisme explicatif. Bien que connu comme affectant la structure des communautés, cette caractéristique est rarement prise en considération dans les études (Fontana et al., 2016) et encore moins dans les études à haute résolution. D'ailleurs, à ma connaissance, l'intégration *in situ* des caractéristiques des traits et leur variabilité à une échelle si fine n'est pas documentée. L'exemple le plus marquant est l'absence de relation allométrique de la fluorescence rouge par cellule. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées : 1) l'effet package des pigments surtout chez le microphytoplancton, 2) il peut s'agir de la même espèce mais une variable environnementale peut jouer sur l'émission de fluorescence (interaction avec le quenching non-photochimique) et enfin 3) il peut tout simplement s'agir d'espèces

différentes des caractéristiques très proches mais répondant différemment aux variables environnementales.

### **Dynamique spatiale ou temporelle ?**

Les études à haute fréquence lors des campagnes se déroulent sur des périodes allant de quelques jours à un mois sur de larges zones d'études. Ces stratégies sont très révélatrices de la dynamique spatio-temporelle à petite échelle du phytoplancton, notamment à cause des taux de croissance des différentes espèces phytoplanctoniques qui peuvent être courts (division journalière à infra journalière). Cette stratégie présente néanmoins une limite. En effet, la caractérisation des communautés phytoplanctoniques à l'échelle de la campagne CAMANOC (environ 600 km sur 1 mois) intègre la variabilité spatiale et la variabilité temporelle puisqu'au fur et à mesure que le navire progresse spatialement, le temps s'écoule, il est alors nécessaire de distinguer la part temporelle et la part spatiale impliquées dans la variabilité des communautés phytoplanctoniques. Dans les travaux présentés au cours des chapitres 3 et 5, il n'a malheureusement pas été possible de dissocier ces deux composantes d'où l'utilisation du terme variabilité ou structure spatio-temporelle. La procédure envisageable pour caractériser et quantifier cet effet serait de répliquer dans le temps plusieurs stations, à l'échelle saisonnière par exemple, comme lors des campagnes CGFS, IBTS de l'IFREMER ou alors selon la stratégie de l'Institut Flamand pour la Mer (VLIZ) qui réalise depuis au moins trois ans maintenant des campagnes annuelles au printemps avec les mêmes stations d'une année sur l'autre, en Manche orientale et sud de la Mer du Nord, de l'estuaire de l'Authie aux estuaires belgo-néerlandais. A échelle locale, cette stratégie peut s'appliquer sur des réseaux de suivis côtiers de longue durée, tels que la radiale de la Baie Saint Jean à Wimereux, transect DYPHYRAD effectué sur 9 stations sur 6 miles nautiques où des premières analyses ont déjà été faites (Bonato et al., 2016; Houliez et al., 2013), et sur les radiales SRN du REPHY (e.g. Lefebvre et al., 2011). La réplication dans le temps de ces stations, étudiées via une analyse triadique partielle pourrait

alors permettre d'observer la dynamique inter-annuelle ou saisonnière à partir des stations, à l'instar de ce qui a été réalisé sur les paramètres photosynthétiques du phytoplancton par Houliez et al. (2013). L'utilisation du partitionnement de variance, quant à lui, permettrait de quantifier l'effet purement temporel et l'effet purement spatial. Cette analyse ne semble pas adéquate pour les enregistrements réalisés en continu puisqu'il y a une probabilité très faible de suivre exactement la même route entre les investigations. Dans le cas d'analyses en continu, la définition d'une zone tampon (buffer) autour d'un échantillon pourrait permettre de réaliser ces analyses. Toutefois, l'utilisation d'une zone tampon peut amener à dégrader la fréquence du signal d'analyse. Cette méthodologie a été utilisée dans deux cas lors d'analyses rentrant dans le cadre de cette thèse : pour l'intercomparaison entre les 3 cytomètres en flux automatisés (chapitre 2) et pour les chevauchements de zone entre campagnes océanographiques (chapitre 4). Les zones de chevauchement lors des campagnes PHYCO-VLIZ et VLIZ-RWS ont mis en évidence que les variations d'abondance dans les communautés phytoplanctoniques sont largement expliquées par des variations spatiales plutôt que des variations temporelles ou dues à l'environnement.

### **Les niches écologiques des groupes fonctionnels**

Cette partie, développée dans le chapitre 4 et en partie dans le chapitre 5, correspond aux premières approches décrivant les niches spatiales des groupes cytométriques sur la totalité du spectre de taille du phytoplancton. Ces études se sont intéressées aux niches écologiques pendant des périodes de développement de blooms printaniers. Des ségrégations spatiales ont pu être mises en évidence entre les groupes. En Manche orientale/sud de la Mer du Nord, la ségrégation spatiale a eu lieu au printemps 2017 entre les groupes picophytoplanctoniques et le microphytoplancton, incluant des dinoflagellés autotrophes et des diatomées autres que le genre *Pseudo-nitzschia* spp., la diatomée du genre *Pseudo-nitzschia* spp. et l'haptophyte *Phaeocystis globosa*. En Mer Baltique, dans le Kattegat et le Skagerrak, la ségrégation spatiale est apparente

sur les dimensions horizontales et nettement plus marquée sur la dimension verticale, dans la couche euphotique et la couche de mélange et concerne les groupes à dominance de phycoérythrine (fluorescence orange) et les groupes à dominance de chlorophylle *a* (fluorescence rouge).

Traditionnellement, l'étude des niches écologiques est réalisée sur des données d'abondance d'espèces déterminées en microscopie. Cette façon de déterminer les niches écologiques permet de définir la niche de chaque espèce et correspond en fait au niveau de définition de la niche qu'en faisait Evelyn Hutchinson (Hutchinson, 1959). Il a été démontré cependant que les espèces appartenant au même phylum ou au même groupe fonctionnel avaient tendance à avoir des niches similaires. Cette observation fait alors état que les espèces exerçant le même rôle/la même fonction écologique dans les écosystèmes, le plus souvent des fonctions biogéochimiques, sont redondantes du point de vue de leur niche (= redondance fonctionnelle). Lorsqu'il n'y a pas de fonctions écologiques impliquées, le regroupement d'espèces selon des critères morphologiques et physiologiques, est défini comme de la complémentarité fonctionnelle (Loreau et al., 2001). C'est dans ce sens que l'utilisation des propriétés optiques des cellules/colonies est justifiée, à travers la signature optique des particules et la définition des traits cytométriques de chaque groupe fonctionnel. De plus, il est parfois possible de caractériser des groupes fonctionnels *sensu stricto*, comme les coccolithophores qui sont des calcifieurs (dans ce cas caractérisant également un groupe taxonomique d'haptophyte). Ainsi, en pratique, l'étude des niches écologiques s'affranchit parfois de la notion d'espèce et des espèces cryptiques et on retrouve des études obtenues par des regroupements d'espèces via microscopie (Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018), ou des études sur les groupes pigmentaires (à partir des analyses de pigments par HPLC) selon la méthode CHEMTAX (Xiao et al., 2018) et sur les types fonctionnels phytoplanctoniques (PFTs; Brun et al., 2015; Terseleer et al., 2014), par méthodes moléculaires (Bunse et al., 2016), par mesure

spectrale via les satellites (d'Ovidio et al., 2010) ou fluorométrie de terrain (Beisner and Longhi, 2013). Les mesures sur les groupes pigmentaires (HPLC, mesures spectrales) présentent deux avantages indéniables vis-à-vis de l'étude par rapport aux espèces : elles permettent d'éviter la redondance fonctionnelle, comme vu précédemment, mais également d'étudier l'entière du spectre de taille chez le phytoplancton. Les mesures par satellite permettent de caractériser les niches écologiques à haute résolution spatiale et temporelle. La distribution des PFT obtenus à partir d'algorithmes comme le PHYSAT est réalisée à partir de la modélisation (d'Ovidio et al., 2010; Vogt et al., 2013). L'utilisation de l'hypothèse de Baas Becking « Everything is everywhere but the environment selects » permet ainsi de définir les niches écologiques sur la base des PFT dominants. Malheureusement, en milieu côtier, le CDOM et que la charge en particules en suspension (MES) sont beaucoup plus variables qu'en milieu ouvert ce qui nécessite l'utilisation d'algorithmes adaptés (Mouw et al., 2017). Actuellement, si la distinction des particules détritiques vis-à-vis des particules organiques est avancée, les algorithmes en télédétection permettant l'estimation du CDOM ne sont pas encore capables de discriminer les groupes fonctionnels au niveau côtier (Bracher et al., 2017; Mouw et al., 2017). De plus, les mesures optiques par satellite sont limitées par la couverture nuageuse, la couverture de glace et la disponibilité en lumière (Bracher et al., 2017). Ces limitations sont le plus souvent rencontrées aux hautes latitudes compliquant ainsi les mesures. Dans ce sens, Thyssen et al. (2015) a montré la pertinence de la cytométrie en flux automatisée comme réalité de terrain des mesures spectrales par satellite et l'utilisation de l'algorithme PHYSAT (Alvain et al., 2008, 2005) en présence de couverture nuageuse alors que d'autres algorithmes peuvent être aussi utilisés mais restent à tester (e.g. PhytoDOAS, Bracher et al., 2017). L'algorithme PHYSAT ayant servi à l'analyse des niches des PFT en océan ouvert, le lien permet d'établir que la cytométrie automatisée est un outil pertinent pour analyser les niches écologiques au niveau côtier.

Les résultats ont montré qu'en Manche orientale et sud de la Mer du Nord, la ségrégation spatiale est principalement due aux paramètres hydrologiques comme montrés dans d'autres études côtières (W. Xiao et al., 2018). Toutefois, nos résultats ont également montré que nos variables explicatives n'intégraient pas la totalité de la variabilité des niches. En effet, dans des écosystèmes de type eutrophe, ce sont les paramètres environnementaux qui gouvernent la biomasse, les abondances et d'autres variables structurantes, abiotiques comme l'hydrodynamisme, les nutriments, la turbidité et la lumière. L'intégration de ces composantes permet d'améliorer la compréhension et d'expliquer les interactions de type « bottom-up » dans le contrôle des communautés phytoplanctoniques. Il faut cependant considérer que la prédation, le parasitisme et la compétition sont présentes (régulation de type « top-down ») et ces pressions participent, à certaines périodes et dans certains écosystèmes d'avantage que dans d'autres, à faciliter le développement d'un stade de vie d'une espèce au détriment d'un autre (Pančić and Kjørboe, 2018). Parmi les facteurs impliqués en milieu côtier dans la régulation de l'abondance du phytoplancton et régulant la phénologie des espèces, on relève les nutriments et la lumière. La lumière est un paramètre extrêmement variable, dans les quatre dimensions (3 dimensions spatiales et la dimension temporelle) et ces échelles de variabilité de la lumière étant plus petites que l'échelle de variation des abondances. Pour ces raisons, la mesure de la lumière à l'instant  $t$  n'intègre pas l'histoire lumineuse des cellules et des colonies nécessaires aux processus de croissance et donc des changements dans les abondances d'un groupe. Le choix a donc été fait de ne pas la prendre en compte dans les analyses mais la profondeur euphotique a toutefois été calculée car les cellules et colonies douées de phototaxie peuvent se positionner rapidement pour avoir accès à la lumière dans la colonne d'eau. En revanche, les nutriments auraient pu être pris en compte car ils sont beaucoup plus stables dans le temps. Leur échelle de variabilité est plus proche de l'échelle de variation des abondances. Cependant, les concentrations mesurées à l'instant  $t$  reflètent plutôt le devenir de la biomasse et des abondances

phytoplanctoniques à l'instant  $t+1$  dont l'écart temporel est régi par le taux de croissance d'une espèce. L'obtention de ces nutriments à haute fréquence n'a pas pu être possible, notamment pour des raisons techniques liées à la mesure des nutriments en milieu marin mais leur mesure aurait permis d'accroître l'explication de la distribution et de la ségrégation spatiale des groupes fonctionnels phytoplanctoniques. Dans cette discussion, une section est développée plus loin et aborde de la prise en compte des nutriments et leur mesure à haute fréquence en milieu marin.

En considérant la même zone d'étude, il est possible de comparer des études spatiales et/ou temporelles (Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018) avec le chapitre 4 de cette thèse dont l'emprise est à large dominance spatiale (voir section de cette Discussion : *Dynamique spatiale ou temporelle*). La comparaison permet d'émettre l'hypothèse que l'ajout des nutriments dans les études à basse fréquence ne permet pas de mieux expliquer les niches que les seuls paramètres enregistrés à haute fréquence (bathymétrie, température, salinité et distance à la côte). La raison de cette différence peut être due à l'unité de base considérée lors de ces études. D'un côté l'espèce est choisie comme unité de référence (Hernández Fariñas et al., 2015; Karasiewicz et al., 2018), de l'autre (chapitre 4), le groupe fonctionnel défini par cytométrie englobe un ensemble d'espèces phytoplanctoniques (ou un morphotype d'une seule espèce (comme dans le cas de *Phaeocystis globosa*) partageant des propriétés optiques similaires qui sont assimilées à des traits dans ce manuscrit. La définition des niches écologiques au niveau de l'espèce tend à détecter essentiellement la variation statistique au niveau de l'espèce. En partant du concept de redondance écologique, la redondance entre espèces est plus importante que la redondance entre les formes, elle-même plus grande que la redondance de taille (Roselli et al., 2017). De ce fait, en agglomérant des espèces ayant des traits morphologiques et physiologiques similaires, on agrandit potentiellement la niche totale de l'ensemble des espèces contenues. Ainsi, on détecte davantage de variation statistique (Fabbro and Duivenvoorden, 2000; Kruk, 2002). Suivant ce raisonnement, l'ajout des

nutriments pourrait particulièrement améliorer l'explication de la distribution et de la ségrégation spatiale des groupes fonctionnels phytoplanctoniques se traduisant d'un point de vue statistique par davantage de variabilité captée par les analyses.

La mesure *in situ* des nutriments combinée à une augmentation de leur fréquence d'échantillonnage est nécessaire pour relier les changements spatiaux et temporels dans les communautés phytoplanctoniques avec les potentiels gradients de nutriments. Un large effort est fait dans ce sens pour rendre les appareils embarquables et utilisables sur le terrain (Daniel et al., 2020). Actuellement, les mesures *in situ* des nutriments se font par des analyseurs chimiques (NAS-3X, Mills et al., 2005 ; CHEMINI, Vuillemin et al., 2009 ; Digiscan, Plant et al., 2009), capteurs optiques à UV (ISUS/SUNA, Seabird Scientific ; ProPS/OPUS, TRIOS) ou des capteurs électrochimiques (Barus et al., 2018, 2016). Cependant, le choix dans le type de capteur doit prendre en compte le type de suivi à réaliser (eulérien, lagrangien, mixte) ainsi que les caractéristiques physico-chimiques et bio-optiques des masses d'eaux (gradients de salinité et de température, MES, CDOM ; Daniel et al., 2020). En dépit des différents capteurs *in situ* de nutriments utilisés, très peu peuvent être configurés en « injection de flux automatisé », c'est-à-dire, comme le CytoSense, les FerryBoxes (Petersen et Ove Möller, 2017). Dans leur rapport pour JERICO-NEXT, Petersen et Ove Möller (2017), indiquent que pour le moment, le CEFAS (NAS-3X sur la bouée SmartBuoy ; Mills et al., 2005) et l'IFREMER (CHEMINI sur la bouée MAREL et MOLIT ; Vuillemin et al., 2009) sont les seules institutions à avoir mis en place des capteurs automatisés *in situ* en Europe. Ces systèmes ont permis d'améliorer la fréquence d'échantillonnage sur les bouées et plateformes où ils ont été déployés mais une analyse à haute fréquence comme recherchée et obtenue dans nos différentes campagnes (1 mesure toutes les 10 minutes) est pour l'instant impossible (1 mesure toutes les 2 heures). Cependant, ce type de capteurs auraient pu être déployé en Mer Baltique afin d'accroître la résolution spatiale des nutriments et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les stations



échantillonnées l'ont été avec un pas de plusieurs heures, ce qui est inférieur à la résolution temporelle possible par les analyseurs de nutriments précédemment énoncés (1 mesure toutes les 2 heures). Ensuite, la Mer Baltique possède une salinité plus faible (< 10 PSU) que les autres écosystèmes côtiers échantillonnés (> 30 PSU), sauf à proximité des estuaires de la Seine, de la Tamise et de l'Escaut-Meuse-Rhin, accroissant la fiabilité des capteurs car le bromure (un des sels contenus dans l'eau de mer) a un signal proche et de la même amplitude que les nitrates dans les ultraviolets (Petersen et Ove Möller, 2017). Enfin, grâce à leur capacité d'embarquement, les navires scientifiques permettent le déploiement de ces capteurs. Ces dernières années, des groupes de travail européens<sup>14,15,16</sup> se sont penchés sur des capteurs pour les améliorer et harmoniser les mesures *in situ*. Les efforts doivent être poursuivis dans ce sens. L'utilisation de l'apprentissage machine à partir des paramètres physico-chimiques autres que les sels nutritifs issus de stations fixes peut également servir d'alternative pour une estimation des concentrations en nutriment comme le montre Castrillo et García (2020). Dans cette étude, l'estimation des sels nutritifs (nitrate, ammonium, phosphore total) se fait via la comparaison des modèles linéaires et de modèles non-linéaires (algorithme « Random Forrest ») utilisant comme variables prédictives la température, la conductivité, le débit du cours d'eau, la turbidité, le pH, la concentration en chlorophylle *a* avec les mesures *in situ* traditionnelles. Les résultats montrent de très bonnes estimations en utilisant les modèles non-linéaires. Néanmoins, ces estimations sont faites en eau douce. Il pourrait alors être intéressant de transposer cette étude (Castrillo and García, 2020) sur l'apprentissage machine au milieu marin en vue de combler le déficit en mesures à haute fréquence, en attendant qu'un capteur fiable soit réellement adapté à ces mesures.

---

<sup>14</sup> <http://www.senseocean.eu/>

<sup>15</sup> <http://www.schema-ocean.eu/>

<sup>16</sup> <http://www.jerico-ri.eu/>

L'étude des changements dans la composition des communautés phytoplanctoniques à haute fréquence a été réalisée grâce à la mesure contribution de chaque site (contribution locale) à la diversité  $\beta$ . Cet indice de diversité donne donc une valeur par site échantillonné, ce qui en fait un outil puissant dans les analyses spatiales et temporelles acquises à haute fréquence. L'utilisation des groupes phytoplanctoniques fonctionnels a été rendu possible car la mesure de la LCBD est indépendante du niveau taxinomique ou fonctionnel considéré (L. J. Xiao et al., 2018). De plus, des comparaisons antérieures entre classifications taxinomiques, de groupes fonctionnels et de groupes fonctionnels morphobiologiques, ont montré que les groupes fonctionnels et les groupes fonctionnels morphobiologiques ont tendance à mieux détecter les variations dans les communautés qu'une classification taxinomique et ce, malgré une richesse plus faible que la richesse spécifique (L. J. Xiao et al., 2018). Dans notre étude (chapitre 4), la composition des communautés est définie sur la base des groupes fonctionnels phytoplanctoniques, donc sur des groupes identifiés à chaque site, ce qui fait que les changements lors de la campagne ne sont pas liés aux données d'occurrence mais aux seules données d'abondance. La LCBD a montré, comme attendu, qu'elle est particulièrement adaptée aux données spatiales acquises à haute fréquence pour détecter les changements dans les communautés présentes. De précédentes études ont mis en évidence les sites à la composition remarquable grâce à la LCBD utilisée comme analyse spatialisée (Legendre and Gauthier, 2014) ou comme analyse temporelle pour caractériser des périodes remarquables (Rombouts et al., 2019) ou les deux à la fois (Legendre, 2019) ainsi que les espèces (ici des groupes fonctionnels phytoplanctoniques) qui y contribuent le plus via la SCBD. Bien que la LCBD et la SCBD aient été utilisées pour la description de la spatialisation des communautés phytoplanctoniques en eau douce, à la fois sur la base des espèces, des groupes fonctionnels et des groupes fonctionnels morpho-physiologiques (L. J. Xiao et al., 2018), l'utilisation de la LCBD et de la SCBD en milieu marin présente peu d'applications sur les espèces

phytoplanctoniques marines (Rombouts et al., 2019). En revanche, l'utilisation sur des données de diversité fonctionnelle (et non pas taxinomique) spatialisées et non réparties de manière homogène (comme dans le cas de campagne océanographique) représente une nouvelle application de cette analyse en milieu marin. Notre étude a mis en évidence des changements dans la composition des communautés en Baie de Seine imputés aux diatomées pennées, au niveau des estuaires belgo-néerlandais et au niveau du Marsdiep (détroit le plus occidental entre la Mer du Nord et la Mer des Wadden), inférées aux stades de vie de *Phaeocystis globosa*. Ces observations sont largement reportées dans les études des blooms de diatomées et de *Phaeocystis globosa* dans ces zones. En revanche, la mise en évidence d'alternance de patches de fortes et de faibles abondances chez le phytoplancton par la LCBD n'avait pas été encore réalisée. De même que la présence d'un petit patch à forte abondance de coccolithophores en Mer du Nord, à proximité du front Frisian, la zone étant connue pour être propice au développement de coccolithophores mais pas en aussi larges proportions où nous avons 20 et 55 fois plus de coccolithophoridés que les études de référence, respectivement en microscopie (Charalampopoulou et al., 2011) et en cytométrie en flux (Thyssen et al., 2015). Plusieurs hypothèses pouvant s'additionner peuvent être émises à cette observation. Soit notre protocole d'analyse n'est pas adapté à la détection des coccolithophoridés et leur détection a été confondue avec des particules faibles fluorescentes avec un fort sideward scatter caractéristique des coccolithophoridés, soit nous avons surestimé les abondances de coccolithophoridés en y incluant d'autres groupes comme les dinoflagellés avec des thèques, soit notre faible volume analysé lors du protocole en continu par rapport à la microscopie (1 à 2 mL contre 100 à 200 millilitres pour quantifier les coccolithophoridés) surestimait très fortement les abondances de coccolithophores. Comme énoncé précédemment, parmi ces indices de diversité  $\beta$ , les changements de communauté (i.e. LCBD) sont en grande partie le reflet des changements environnementaux tandis que la réponse des groupes cytométriques (i.e. SCBD) est due à leurs

paramètres de niche puisque les paramètres de niche peuvent décrire la relation espèces/groupes fonctionnels avec leur environnement (da Silva et al., 2018; Heino and Grönroos, 2017).

Des régressions  $\beta$  ont mis en évidence que la température, la salinité et la distance à la côte sont des variables structurantes de la LCBD en milieu côtier. Cela traduit que le changement des communautés est relatif à un gradient côte-large particulièrement sensible à l'éloignement aux estuaires. En effet, les propriétés physico-chimiques dans les zones estuariennes sont très différentes (variations de température, salinité, stabilité de la colonne d'eau) des propriétés physico-chimiques des eaux du large et des côtes qui ne sont pas sous influence des rivières et des fleuves. Bien que les modèles soient significatifs, en réalité d'autres paramètres rentrent en compte dans la variation spatiale des communautés phytoplanctoniques. Comme discuté ci-dessus, les communautés phytoplanctoniques sont particulièrement influencées par la disponibilité en nutriments inorganiques majeurs et mineurs, pouvant expliquer la dominance de tel ou tel groupe fonctionnel. Ainsi, l'ajout de nutriments à haute résolution pourrait affiner la réponse (i.e. valeurs de LCBD) au modèle linéaire. Il existe un contrôle « top-down » qui permet la régulation des blooms. Par exemple, la présence de ciliés n'affecte pas la croissance des copépodes. En revanche, ciliés et petites colonies de *P. globosa* sont des proies pour les copépodes dont l'affinité est plus grande pour les ciliés. De plus, les dinoflagellés hétérotrophes ont été précédemment observés comme prédateurs de diatomées (Sherr and Sherr, 2007) mais aussi de petites colonies de *P. globosa* (Grattepanche et al., 2011). En l'absence de dinoflagellés hétérotrophes, les copépodes pourraient donc avoir tendance à contrôler d'abord les populations de ciliés, permettant la croissance des colonies de *P. globosa*, alors que dans le cas où les copépodes et les dinoflagellés sont présents, la croissance des colonies de *P. globosa* serait limitée. Ces interactions sont donc le reflet d'une forte régulation des blooms, aussi bien de diatomées que de *P. globosa* par la prédation et nécessitent d'être prises en compte dans les futures analyses des successions des blooms printaniers. Considérant les contrôles « top-down »

et « bottom-up » énoncés précédemment, il serait alors possible de dégager les variables les plus structurantes à cette époque-ci de l'année. En ce qui concerne la contribution des groupes, l'étude présentée dans le chapitre 4 se focalise sur les paramètres des niches alors que les traits fonctionnels morpho-physiologiques (dérivés des propriétés optiques) peuvent également jouer un rôle dans la présence/absence ainsi qu'être responsable des abondances d'un groupe cytométrique. Cette hypothèse est uniquement suggérée au cours du chapitre 4 et étudiée sur les abondances mais non la SCBD dans le chapitre 5. Toutefois, une ébauche du travail sur la SCBD à partir des données du chapitre 4 a été présentée en conférence (Fig. 58). Cette perspective n'est pas incluse dans le chapitre 4 car elle présente l'inconvénient de considérer des traits moyennés par masse d'eau sans intégrer leur variabilité alors que d'autres études s'y sont intéressées (da Silva et al., 2018; Heino and Grönroos, 2017; Krasnov et al., 2019). Une tendance semble toutefois se dégager et les traits seuls sont de meilleurs prédicteurs pour expliquer la SCBD tandis que les paramètres de niches sont moins bons (Fig. 58). Il y a un effet additif entre les traits et les paramètres de niche dans l'explication des SCBD. En effet, la complémentarité des différentes caractéristiques intrinsèques aux groupes fonctionnels phytoplanctoniques reste le meilleur prédicteur allant de 37% à 90%. Cette ébauche d'analyse montre que les plus fortes valeurs de SCBD sont dues principalement aux valeurs de traits puis ensuite aux paramètres de niche. En d'autres termes, les groupes les plus fréquemment observés et les plus abondants, le sont grâce à une performance optimale de leurs traits et à leur capacité à acquérir des ressources dans l'environnement. Les PFGs caractérisés dans ce travail sont définis à partir des propriétés optiques lesquelles sont elles-mêmes assimilées à des traits. Or pour un même PFG, ces traits ne sont pas figés. Ils présentent des variations dans l'espace et dans le temps. Ce sont ces variations entre masses d'eaux ou zone d'étude qui permettent d'expliquer le « succès » d'un groupe par rapport à un autre. Le succès biologique d'un PFG étant défini comme la capacité d'un PFG à supplanter et à remplacer d'autres PFGs vis-à-vis des

conditions environnementales. Ce « succès » se reflète ainsi sur les valeurs de SCBD. L'ébauche de résultat présentée dans la figure 58 diffère des autres études qui se sont focalisées sur cette problématique où les paramètres de niche (da Silva et al., 2018; Heino and Grönroos, 2017) et la biogéographie (Krasnov et al., 2019) se révèlent être de meilleurs prédicteurs que les traits. Dans le résultat de Krasnov et al. (2019), l'absence de descripteurs spatiaux définissant par exemple la dispersion et étant particulièrement importants chez le phytoplancton pourrait alors être une explication à cette différence. Cette problématique est étudiée au cours du chapitre 5 à partir des abondances brutes et non pas de la contribution de chaque groupe à la diversité  $\beta$ .

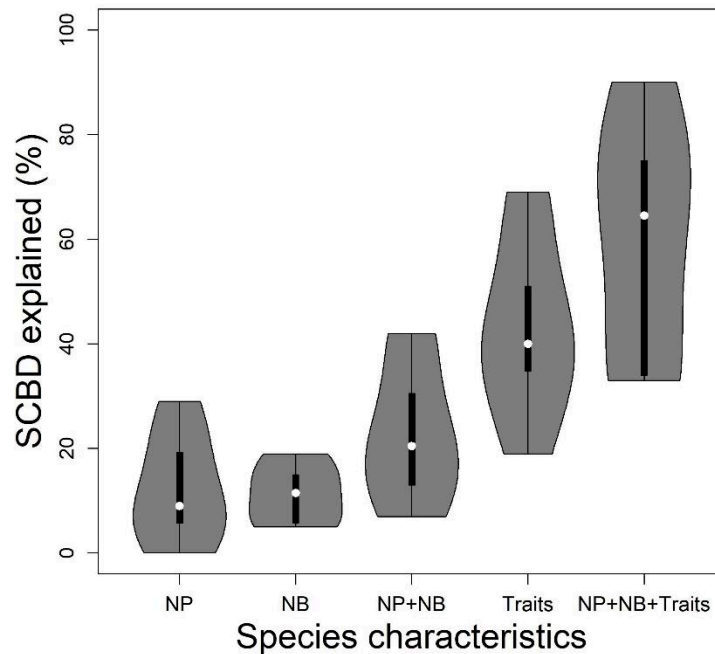


Figure 58 : Relation entre SCBD et caractéristiques intrinsèques des groupes cytométriques lors des campagnes PHYCO, VLIZ et RWS. Les données sont les données moyennées par masse d'eau (NP : marginalité, NB : tolérance environnementale, traits).

Trois indicateurs des habitats pélagiques (PH) ont été développés dans le cadre de la convention OSPAR - ICG COBAM<sup>17</sup> pour l'évaluation du bon état écologique des masses d'eaux. Ces différents indicateurs se basent sur l'utilisation des formes de vie planctonique (e.g. dinoflagellés et diatomées, petit et grand phytoplancton, PH1; McQuatters-Gollop et al., 2019), des abondances et de la biomasse totales (PH2) ainsi que des mesures de diversité (PH3; Rombouts et al., 2019) avec notamment la LCBD. Leur application dans le cadre de la Directive Cadre Stratégie sur le Milieu Marin (DCSMM) se fait au travers du descripteur Diversité (D1). L'application de ces indicateurs se fait actuellement par les données acquises sur des stations fixes des réseaux de surveillance déjà mis en place (e.g. REPHY, PHYTOBS ou Station L4 de Plymouth, Rombouts et al., 2019), omettant la plupart du temps la résolution spatiale à petite échelle, aussi bien pour les eaux côtières que les eaux du large (plus rarement échantillonnées, sauf pour les mesures en continu avec le Continuous Plankton Recorder-CPR). Dans le chapitre 4, l'utilisation de la LCBD et de la SCBD montre ainsi la possibilité d'utiliser le CytoSense comme méthode permettant de caractériser la diversité fonctionnelle du phytoplancton pour détecter les changements spatiaux dans la composition des communautés planctoniques à haute fréquence (indicateur PH3). L'utilisation de la haute fréquence peut alors permettre d'augmenter la résolution spatiale et temporelle entre les stations fixes où les méthodes d'échantillonnages et d'analyses traditionnelles (e.g. microscopie) sont pour l'heure les seules indiquées dans les calculs d'indices de diversité du PH3 (Jouandet et al., 2019).

### **Quels sont les mécanismes responsables de la distribution et des abondances des groupes à petite échelle dans des écosystèmes stratifiés ?**

Cette question étudiée dans le chapitre 5 montre que la distribution horizontale des groupes est fortement liée au gradient de salinité très important dans cette aire d'étude. Les résultats de

---

<sup>17</sup> <https://oap.ospar.org/en/ospar-assessments/intermediate-assessment-2017/biodiversity-status/habitats/>

l'analyse en composantes principales montrent que la zone est partitionnée en trois (golfe de Finlande, Mer Baltique et, avec une composition radicalement différente des deux zones précédentes, les détroits du Kattegat et Skagerrak) comme auparavant montré pour les communautés bactériennes (Herlemann et al., 2011) et le plancton dans son ensemble (Hu et al., 2016). La Mer Baltique et le golfe de Finlande possèdent des communautés phytoplanctoniques très différentes du Kattegat et du Skagerrak. Toujours sur les dimensions horizontales, cette étude n'a pas permis d'observer des changements aussi nets dans la composition des assemblages phytoplanctoniques à petite échelle que dans d'autres régions à l'hydrodynamisme bien plus marqué (i.e. Manche orientale et Mer du Nord, chapitre 4, Bonato et al., 2015; Thyssen et al., 2015). La principale explication vient du fait que l'hydrodynamisme de la Mer Baltique est beaucoup moins complexe qu'en Manche orientale/Mer du Nord. Les caractéristiques les plus remarquables de la Mer Baltique sont le large gradient de salinité, la stratification haline permanente et l'ouverture unique vers la Mer du Nord, tandis que la Mer du Nord et la Manche orientale sont soumises à des variations des courants dues au cycle des marées (journalières, alternance vives-eaux/mortes eaux), aux apports continus en eau douce mais aussi aux débits variables. Malheureusement, il n'a pas été possible de caractériser la dynamique du phytoplancton en sub-surface, à haute résolution spatiale en relation avec les paramètres hydrologiques enregistrés à haute fréquence car ils n'ont pas été obtenus à temps. Les larges patches d'abondance observés par groupes fonctionnels phytoplanctoniques n'ont donc pas pu être imputés à des conditions environnementales particulières. Dans cette étude, l'utilisation de la LCBD montrée dans le chapitre 4, aurait peut-être pu permettre de détecter des changements plus fins dans la composition des assemblages phytoplanctoniques car l'objectif principal de ce chapitre est de mettre en évidence la distribution dans la colonne d'eau et de relier les paramètres qui conditionnent les abondances dans la colonne d'eau.

Bien que l'étude sur les dimensions horizontales n'ait pas permis de révéler de forts gradients



sur de petites échelles, l'étude de la dimension verticale a mis en évidence une ségrégation verticale des groupes cytométriques ainsi qu'une ségrégation horizontale sur la zone étudiée. Le plus souvent, dans plusieurs études, le facteur le plus important dans la distribution et les abondances est la stratification, quel que soit le type trophique de l'écosystème considéré (Mena et al., 2019; Skyllas et al., 2019). Dans nos résultats, la plupart du temps les fortes abondances ainsi que la mesure de marginalité des groupes fonctionnels phytoplanctoniques suivent la profondeur de la couche de mélange ainsi que son évolution. Cela montre une influence des paramètres environnementaux et des niches sur la distribution et les abondances chez le phytoplancton. En effet, de nombreux processus physiologiques, biologiques, mais également physico-chimiques sont liés à cette couche de mélange tels que la prédation, la circulation des nutriments, la disponibilité en lumière et la température (Irwin et al., 2012).

Initialement énoncés par Gaston and Blackburn (2007) comme concept en écologie puis repris et adaptés ensuite au phytoplancton notamment par Derot et al. (2020), les mécanismes contrôlant les assemblages d'espèces ainsi que leurs abondances sont les interactions biotiques, les filtres environnementaux, les processus régionaux (dispersion) et les pools locaux d'espèces. Au cours du chapitre 5, l'importance de ces mécanismes a été étudiée via des modèles généralisés linéaires. Les modèles généralisés linéaires (GLM) sont préférés aux modèles généralisés additifs (GAM) parce qu'ils sont plus transférables dans l'espace et dans le temps que les modèles généralisés additifs (Randin et al., 2006). De plus les GLM permettent d'étudier plusieurs types de distribution possible pour la variable réponse (Broennimann et al., 2012). Les résultats ont montré que les traits sont les meilleurs prédicteurs des abondances des différents groupes cytométriques par rapport aux paramètres de niche et aux variables environnementales et ce, dans un environnement stratifié. A l'échelle des échantillonnages discrets réalisés, il n'y a pas de dispersion. Cette absence de dispersion dans les assemblages montre l'absence de structuration à la mésoéchelle et macroéchelle (les paires de stations sont

distances de 26 à 360 km). Ce qui corrobore l'observation de larges patches à la sub-mésoéchelle voire aux petites distances dans la mésoéchelle. L'estimation de la dispersion en sub-surface via les données à haute fréquence acquises par le cytomètre en flux en sub-surface aurait alors pu confirmer cette hypothèse car l'objectif de ce chapitre était la mise en évidence des mécanismes responsables de la structuration des groupes fonctionnels phytoplanctoniques dans la colonne d'eau.

L'importance des traits fonctionnels vis-à-vis des paramètres de niche dans la distribution et les concentrations est en contradiction avec des nombreuses études similaires sur les invertébrés aquatiques (Heino and de Mendoza, 2016; Heino and Grönroos, 2014; Heino and Tolonen, 2018), sur les invertébrés terrestres (Marino et al., 2020) mais également sur des diatomées dulcicoles (Heino and Soininen, 2006). Ces études montrent que les paramètres de niche sont de meilleurs prédicteurs que les traits biologiques dans le contrôle des abondances. Toutefois, quelques études montrent que les traits écologiques peuvent avoir une importance (Rocha et al., 2018; Verberk et al., 2010). Sur ces différences, il est possible d'émettre plusieurs hypothèses. Premièrement, il s'agit du déterminisme génétique. Ces différentes études se basent sur le postulat que les traits chez une espèce donnée répondent systématiquement de la même façon aux gradients environnementaux, c'est à dire que l'environnement induit totalement les valeurs de traits (i.e. plasticité des traits). Or, pour une valeur donnée d'un paramètre environnemental, il y a plusieurs valeurs de trait possibles, il s'agit de la variabilité intra-spécifique. Cette variabilité est gouvernée par les déterminismes génétiques et phénotypiques. Dans le chapitre 5, la réduction du nombre d'unités écologiques, c'est-à-dire l'agglomération des espèces en groupes fonctionnels, permet de réduire l'effet additif de cette variabilité intra-spécifique. Ce qui amène à capter davantage la réponse des traits vis-à-vis des gradients de ressources et donc, inexorablement, à ce que les traits participent à la prédiction des abondances. Deuxièmement, les interactions biologiques impliquées aussi bien dans le contrôle « top-down » que « bottom-

up » ne sont pas prises en compte dans notre étude. Ces interactions peuvent modifier positivement ou négativement les abondances via une modification de la taille des niches écologiques et la performance des traits vis-à-vis des gradients de ressources. Par exemple, la prédation réduit la taille de la niche et sélectionne les valeurs de traits (Toth et al., 2004; van Donk et al., 2011) tandis que la symbiose agrandit la taille de la niche écologique et accroît les performances écologiques des traits comme cela à pu être observé chez des diatomées qui peuvent contenir des cyanobactéries pour prélever l'azote atmosphérique en océan ouvert (Carpenter and Janson, 2000).

Les traits utilisés au cours du chapitre 5 sont mesurables directement sur le terrain. Leur mesure rapide et automatisée ainsi que la démonstration de la pertinence des traits fonctionnels pour la prédiction des abondances et de la distribution se révèlent être intéressantes dans la détection précoce et la distribution spatiale des blooms phytoplanctoniques voire des blooms d'algues nuisibles. En effet, en établissant les paramètres de niches *a priori*, les enregistrements d'abondance ainsi que les paramètres environnementaux et la mesure des traits fonctionnels pourraient permettre l'estimation de la dynamique et de l'amplitude de ces événements. Il est toutefois important de noter que la cytométrie en flux automatisée de type pulse shape-recording étant une technique ataxonomique par définition, elle ne permet pas de définir avec précision les espèces ou du moins les genres (sauf pendant les blooms), ce qui peut s'avérer délicat dans l'identification d'algues nuisibles puisque leurs cortèges pigmentaires et leurs traits morphologiques peuvent être confondus avec d'autres groupes. C'est notamment le cas pour les diatomées et les dinoflagellés dans le microphytoplancton et *P. globosa* dans le NanoFLR dont les différents stades peuvent être confondus avec d'autres taxons nanophytoplanctoniques possédant les mêmes caractéristiques morphophysologiques. Dans cette thèse, l'utilisation des images a uniquement servi à la caractérisation du groupe *Pseudo-nitzschia* en Manche orientale et sud de la Mer du Nord (chapitre 4) et à la mise en évidence de dinoflagellés et de

cyanobactéries filamenteuses en Mer Baltique et dans les détroits scandinaves (chapitre 5). Néanmoins, l'utilisation de l'imagerie couplée à la signature cytométrique peuvent permettre de discerner les espèces nuisibles (Dugenne et al., 2014; Pereira et al., 2018). L'utilisation de classifieurs via l'apprentissage machine, notamment en prenant en compte les signatures optiques (pulse shapes) d'espèces nuisibles peut alors permettre d'automatiser le processus de détection des particules déjà imagées rendant par la même, la totalité du processus automatisé, de l'acquisition jusqu'au traitement de données. La détection et classification automatisées, qui plus est, si elles sont établies en quasi temps réel, peuvent permettre la détection précoce de blooms d'algues nuisibles ce qui est nécessaire pour améliorer leur compréhension ainsi que primordial pour les politiques publiques vis-à-vis des activités locales.



## Conclusion générale

Cette thèse de doctorat a permis de mettre en évidence la distribution et la composition des communautés phytoplanctoniques à petite échelle, dans les dimensions horizontales et verticales dans des écosystèmes marins côtiers contrastés, dans des situations saisonnières particulières. La réalisation de ce travail a été possible grâce au déploiement d'un cytomètre en flux automatisé sur des navires océanographiques via des projets bénéficiant de partenariats régionaux (CPER MARCO), nationaux (convention MTES-CNRS pour la mise en place de la DCSMM, l'évaluation écologique et le programme de surveillance des habitats pélagiques) et européens (fin du projet INTERREG IVA « 2 mers » DYMAPHY, projet H2020 JERICO-NEXT, actuellement poursuivi par JERICO-S3 et l'élaboration et soumission d'un dossier pour devenir, en regroupant les infrastructures de recherche hébergeant les services nationaux d'observation, une infrastructure européenne, jointe d'observatoires côtiers - JERICO RI) permettant une meilleure prise en compte, un déploiement et l'amélioration des approches automatisées en complément des approches de référence, dans l'observation des écosystèmes côtiers. Il a pu être mis en évidence que la structure des communautés phytoplanctoniques dépend aussi bien des paramètres environnementaux que des caractéristiques propres à chaque groupe, à travers des approches de niche écologique et la définition de traits fonctionnels dérivés des propriétés optiques révélées par les analyses en cytométrie en flux automatisée de type pulse shape-recording). Au cours de cette thèse, nous avons montré la pertinence d'utiliser la classification en groupes fonctionnels phytoplanctoniques, à partir de critères morpho-physiologiques dérivés des propriétés optiques des particules (cellules et colonies) via un cytomètre automatisé pour des mesures de paramètres écologiques et de diversité. Au cours du chapitre 3, la réponse des PFGs est fortement dépendante des paramètres de stabilité de la

colonne qui ont permis de caractériser le front d'Ouessant. Au sein des zones stratifiées (Manche occidentale) et mélangées (Manche centrale), les paramètres physico-chimiques enregistrés à haute fréquence expliquent en partie les variations dans la composition des communautés. Ces paramètres physico-chimiques sont également responsables de la distribution des groupes fonctionnels phytoplanctoniques en milieu côtier. Nous avons montré que l'utilisation des PFGs comme unité de classification peut être appliquée aux indices de diversité. En effet, l'indice de diversité  $\beta$  (LCBD) a permis de détecter les sites caractérisés par des changements de composition des communautés et la contribution des PFGs a pu être mise en évidence par la SCBD. Au cours des chapitres 4 et 5, la classification en PFGs a permis la définition des niches écologiques et leurs implications dans la distribution et leur importance dans les abondances des groupes fonctionnels phytoplanctoniques. Toujours dans le chapitre 5, l'utilisation des traits ainsi que leur amplitude a permis de définir la performance écologique des PFGs dans un gradient de ressource par une réponse exprimée en abondance. Enfin, l'automatisation étant à ce jour disponible pour le compartiment bactérien grâce au développement du CytoPro et du module automatisé onCyt<sup>18</sup> pour cytométrie en flux conventionnelle, le couplage de ces capteurs au cytomètre automatisé devrait permettre d'envisager les interactions dans la boucle microbienne entre les bactéries, les nutriments et le phytoplancton à de fines échelles. Enfin, la technique utilisée, les analyses statistiques réalisées ainsi que les principes écologiques étudiés peuvent être transposés à d'autres écosystèmes, côtiers mais de nature différente (upwelling, zones oligotrophes) ou en océan ouvert afin d'accroître la compréhension, la comparaison et la prédiction dans ces écosystèmes à forte valeur écosystémique et sous pression croissante en réponse à la démographie humaine.

---

<sup>18</sup> <https://oncyt.com/>

# References

- Aardema, H.M., Rijkeboer, M., Lefebvre, A., Veen, A., Kromkamp, J.C., 2019. High-resolution underway measurements of phytoplankton photosynthesis and abundance as an innovative addition to water quality monitoring programs. *Ocean Sci.* 15, 1267–1285. <https://doi.org/10.5194/os-15-1267-2019>
- Aarup, T., 2002. Transparency of the North Sea and Baltic Sea - A Secchi depth data mining study. *Oceanologia* 44, 323–337.
- Agagliate, J., Lefering, I., McKee, D., 2018. Forward modeling of inherent optical properties from flow cytometry estimates of particle size and refractive index. *Appl. Opt.* 57, 1777. <https://doi.org/10.1364/ao.57.001777>
- Aiken, J., Fishwick, J., Moore, G., Pemberton, K., 2004. The annual cycle of phytoplankton photosynthetic quantum efficiency, pigment composition and optical properties in the western English Channel. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 84, 301–313. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0025315404009191h>
- Alahuhta, J., Ecke, F., Johnson, L.B., Sass, L., Heino, J., 2017. A comparative analysis reveals little evidence for niche conservatism in aquatic macrophytes among four areas on two continents. *Oikos* 126, 136–148. <https://doi.org/10.1111/oik.03154>
- Alpine, A.E., Cloern, J.E., 1988. Phytoplankton growth rates in a light-limited environment, San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 167–173.
- Alvain, S., Moulin, C., Dandonneau, Y., Bréon, F.M., 2005. Remote sensing of phytoplankton groups in case 1 waters from global SeaWiFS imagery. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 52, 1989–2004. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2005.06.015>
- Alvain, S., Moulin, C., Dandonneau, Y., Loisel, H., 2008. Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean: A satellite view. *Global Biogeochem. Cycles* 22, 1–15. <https://doi.org/10.1029/2007GB003154>
- Álvarez, E., Nogueira, E., López-Urrutia, Á., 2017. In Vivo Single-Cell Fluorescence and Size Scaling of Phytoplankton Chlorophyll Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–16. <https://doi.org/10.1128/aem.03317-16>
- Aminot, A., Kérouel, R., 2004. *Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses.* Editions Quae.
- Anglès, S., Jordi, A., Campbell, L., 2015. Responses of the coastal phytoplankton community to tropical cyclones revealed by high-frequency imaging flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1562–1576. <https://doi.org/10.1002/lno.10117>
- Artigas, L.F., 2017. PHYCO cruise. <https://doi.org/10.17600/17010500>
- Artigas, L.F., Creach, V., Houliez, E., Karlson, B., Lizon, F., Seppälä, J., Wacquet, G., 2019. JERICO-NEXT: Novel methods for automated in situ observations of phytoplankton diversity and productivity: synthesis of exploration, inter comparisons and improvements. D3.2.



- Arvola, L., Ojala, A., Barbosa, F., Heaney, S.I., 1991. Migration behaviour of three cryptophytes in relation to environmental gradients: An experimental approach. *Br. Phycol. J.* 26, 361–373. <https://doi.org/10.1080/00071619100650331>
- Astheimer, H., 1983. Phytoplankton Spring Bloom Patches in the Skagerrak, Kattegat and Bornholm Basin, in: Sündermann, J., Lenz, W. (Eds.), *North Sea Dynamics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 611–631.
- Baretta-Bekker, J.G., Baretta, J.W., Latuhihin, M.J., Desmit, X., Prins, T.C., 2009. Description of the long-term (1991-2005) temporal and spatial distribution of phytoplankton carbon biomass in the Dutch North Sea. *J. Sea Res.* 61, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.10.007>
- Barnes, M.K., Tilstone, G.H., Smyth, T.J., Suggett, D.J., Astoreca, R., Lancelot, C., Kromkamp, J.C., 2014. Absorption-based algorithm of primary production for total and size-fractionated phytoplankton in coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 504, 73–89. <https://doi.org/10.3354/meps10751>
- Barus, C., Legrand, D.C., Striebig, N., Jugeau, B., David, A., Valladares, M., Parra, P.M., Ramos, M.E., Dewitte, B., Garçon, V., 2018. First deployment and validation of in situ silicate electrochemical sensor in seawater. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00060>
- Barus, C., Romanytsia, I., Striebig, N., Garçon, V., 2016. Toward an in situ phosphate sensor in seawater using Square Wave Voltammetry. *Talanta* 160, 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.057>
- Beardall, J., Allen, D., Bragg, J., Finkel, Z. V., Flynn, K.J., Quigg, A., Rees, T.A. V., Richardson, A., Raven, J.A., 2009. Allometry and stoichiometry of unicellular, colonial and multicellular phytoplankton. *New Phytol.* 181, 295–309. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02660.x>
- Behrenfeld, M.J., 2010. Abandoning Sverdrup’s Critical Depth Hypothesis on phytoplankton blooms. *Ecology* 91, 977–989. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.10.010>
- Beisner, B.E., Longhi, M.L., 2013. Spatial overlap in lake phytoplankton: Relations with environmental factors and consequences for diversity. *Limnol. Oceanogr.* 58, 1419–1430. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.4.1419>
- Bentley, D., Hart, V., Guary, J.C., Statham, P.J., 1999. Dissolved nutrient distributions in the Central English Channel. *Cont. Shelf Res.* 19. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(99)00054-0)
- Bergquist, A.M., Carpenter, S.R., Latino, J.C., 1985. Shifts in phytoplankton size structure and community composition during grazing by contrasting zooplankton assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 30, 1037–1045.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., Falkowski, P.G., 1989. Photoadaptation and the “Package” Effect in *Dunaliella Tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x>
- Bianchi, T.S., Engelhaupt, E., Westman, P., Andrén, T., Rolff, C., Elmgren, R., 2000.

- Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Natural or human-induced? *Limnol. Oceanogr.* 45, 716–726. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0716>
- Bonato, S., Breton, E., Didry, M., Lizon, F., Cornille, V., Lécuyer, E., Christaki, U., Artigas, L.F., 2016. Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore-offshore gradients using flow cytometry: A case study in the eastern English Channel. *J. Mar. Syst.* 156, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.11.009>
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., 2015. High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.037>
- Borcard, D., Legendre, P., 2002. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol. Modell.* 153, 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.01.006>
- Bracco, A., Provenzale, A., Scheuring, I., 2000. Mesoscale vortices and the paradox of the plankton. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 267, 1795–1800. <https://doi.org/10.1002/lipi.19660680811>
- Bracher, A., Bouman, H.A., Brewin, R.J.W., Bricaud, A., Brotas, V., Ciotti, A.M., Clementson, L., Devred, E., Di Cicco, A., Dutkiewicz, S., Hardman-Mountford, N.J., Hickman, A.E., Hieronymi, M., Hirata, T., Losa, S.N., Mouw, C.B., Organelli, E., Raitos, D.E., Uitz, J., Vogt, M., Wolanin, A., 2017. Obtaining Phytoplankton Diversity from Ocean Color: A Scientific Roadmap for Future Development. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00055>
- Brahamsha, B., 1996. An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the nonflagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6504–6509. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6504>
- Bratbak, G., Jacquet, S., Larsen, A., Pettersson, L.H., Sazhin, A.F., Thyrhaug, R., 2011. The plankton community in Norwegian coastal waters-abundance, composition, spatial distribution and diel variation. *Cont. Shelf Res.* 31, 1500–1514. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.06.014>
- Breiman, L., 2001. Random Forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.-M., 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J. Plankton Res.* 22, 1423–1440. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.8.1423>
- Breton, E., Christaki, U., Bonato, S., Didry, M., Artigas, L.F., 2017. Functional trait variation and nitrogen use efficiency in temperate coastal phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 563, 35–49. <https://doi.org/10.3354/meps11974>
- Breton, E., Rousseau, V., Parent, J.Y., Ozer, J., Lancelot, C., 2006. Hydroclimatic modulation of diatom/Phaeocystis blooms in nutrient-enriched Belgian coastal waters (North Sea). *Limnol. Oceanogr.* 51, 1401–1409. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1401>

- Broennimann, O., Fitzpatrick, M.C., Pearman, P.B., Petitpierre, B., Pellissier, L., Yoccoz, N.G., Thuiller, W., Fortin, M.J., Randin, C., Zimmermann, N.E., Graham, C.H., Guisan, A., 2012. Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21, 481–497. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00698.x>
- Brun, P., Vogt, M., Payne, M.R., Gruber, N., O'Brien, C.J., Buitenhuis, E.T., Le Quéré, C., Leblanc, K., Luo, Y.W., 2015. Ecological niches of open ocean phytoplankton taxa. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1020–1038. <https://doi.org/10.1002/lno.10074>
- Brunet, C., Lizon, F., 2003. Tidal and diel periodicities of size-fractionated phytoplankton pigment signatures at an offshore station in the southeastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 56, 833–843. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(02\)00323-2](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00323-2)
- Brussaard, C.P.D., Gast, G.J., Van Duyl, F.C., Riegman, R., 1996. Impact of phytoplankton bloom magnitude on a pelagic microbial food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144, 211–221. <https://doi.org/10.3354/meps144211>
- Bryant, D.A., De Lorimier, R., Guglielmi, G., Stirewalt, V.L., Cantrell, A., Stevens, S.E., 1987. The Cyanobacterial Photosynthetic Apparatus: A Structural and Functional Analysis Employing Molecular Genetics, in: Biggins, J. (Ed.), *Progress in Photosynthesis Research: Volume 4 Proceedings of the VIIth International Congress on Photosynthesis Providence, Rhode Island, USA, August 10--15, 1986*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 749–755. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0519-6\\_156](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0519-6_156)
- Brylinski, J.-M., 1991. Le “fleuve côtier” : un phenomene hydrologique important en Manche orientale (exemple du Pas-de-Calais). *Ocean. Acta* 11, 197–203.
- Brylinski, J.M., Brunet, C., Bentley, D., Thoumelin, G., Hilde, D., 1996. Hydrography and phytoplankton biomass in the Eastern English Channel in spring 1992. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43, 507–519. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0084>
- Brylinski, J.M., Lagadeuc, Y., 1990. L’interface eaux côtières/eaux du large dans le Pas-de-Calais (côte française) : une zone frontale. *Comptes rendus l’Académie des Sci.* 311, 535–540.
- Buchan, A., LeCleir, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>
- Bunse, C., Bertos-Fortis, M., Sassenhagen, I., Sildever, S., Sjöqvist, C., Godhe, A., Gross, S., Kremp, A., Lips, I., Lundholm, N., Rengefors, K., Seftom, J., Pinhassi, J., Legrand, C., 2016. Spatio-temporal interdependence of bacteria and phytoplankton during a baltic sea spring bloom. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00517>
- Cadée, G.C., Hegeman, J., 1991. Historical phytoplankton data of the Marsdiep. *Hydrobiol. Bull.* 24, 111–118.
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A.K., Gustafsson, P., Oquist, G., 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 667–83.
- Cardinale, B.J., Matulich, K.L., Hooper, D.U., Byrnes, J.E., Duffy, E., Gamfeldt, L., Balvanera,

- P., O'Connor, M.I., Gonzalez, A., 2011. The functional role of producer diversity in ecosystems. *Am. J. Bot.* 98, 572–592. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000364>
- Carpenter, E.J., Janson, S., 2000. Intracellular cyanobacterial symbionts in the marine diatom *Climacodium frauenfeldianum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 36, 540–544. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99163.x>
- Carter, C.M., Ross, A.H., Schiel, D.R., Howard-Williams, C., Hayden, B., 2005. In situ microcosm experiments on the influence of nitrate and light on phytoplankton community composition. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 326, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.006>
- Castrillo, M., García, Á.L., 2020. Estimation of high frequency nutrient concentrations from water quality surrogates using machine learning methods. *Water Res.* 172, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115490>
- Cebrián, J., Valiela, I., 1999. Seasonal patterns in Phytoplankton in coastal ecosystems. *J. Plankton Res.* 21, 429–444.
- Celepli, N., Sundh, J., Ekman, M., Dupont, C.L., Yooseph, S., Bergman, B., Ininbergs, K., 2017. Meta-omic analyses of Baltic Sea cyanobacteria: diversity, community structure and salt acclimation. *Environ. Microbiol.* 19, 673–686. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13592>
- Charalampopoulou, A., Poulton, A.J., Tyrrell, T., Lucas, M.I., 2011. Irradiance and pH affect coccolithophore community composition on a transect between the North Sea and the Arctic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 431, 25–43. <https://doi.org/10.3354/meps09140>
- Charria, G., Lamouroux, J., De Mey, P., 2016. Optimizing observational networks combining gliders, moored buoys and FerryBox in the Bay of Biscay and English Channel. *J. Mar. Syst.* 162, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2016.04.003>
- Chen, B., Wang, L., Song, S., Huang, B., Sun, J., Liu, H., 2011. Comparisons of picophytoplankton abundance, size, and fluorescence between summer and winter in northern South China Sea. *Cont. Shelf Res.* 31, 1527–1540. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.06.018>
- Chisholm, S.W., 1992. Phytoplankton Size, in: Falkowski, P.G., Woodhead, A.D. (Eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 213–237.
- Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B., Walschmeyer, N.A., 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340–343.
- Chrétiennot-Dinet, M.-J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J., Machado, M.C., 1995. New Marine Picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 34, 285–292.
- Christaki, U., Kormas, K.A., Genitsaris, S., Georges, C., Sime-Ngando, T., Viscogliosi, E., Monchy, S., 2014. Winter-Summer Succession of Unicellular Eukaryotes in a Mesoeutrophic Coastal System. *Microb. Ecol.* 67, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s00248-013->

- Claquin, P., Ní Longphuirt, S., Fouillaron, P., Huonnic, P., Ragueneau, O., Klein, C., Leynaert, A., 2010. Effects of simulated benthic fluxes on phytoplankton dynamic and photosynthetic parameters in a mesocosm experiment (Bay of Brest, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 86, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.10.017>
- Clayton, S., Nagai, T., Follows, M.J., 2014. Fine scale phytoplankton community structure across the Kuroshio Front. *J. Plankton Res.* 36, 1017–1030. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbu020>
- Collier, J.L., 2000. Flow cytometry and the single cell in phycology. *J. Phycol.* 36, 628–644. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99215.x>
- Cornwell, W.K., Ackerly, D.D., 2009. Community Assembly and Shifts in Plant Trait Distributions across an Environmental Gradient in Coastal California Published by : Ecological Society of America Community across an environmental in plant trait distributions assembly and shifts gradient and. *Ecol. Monogr.* 79, 109–126. <https://doi.org/10.1890/07-1134.1>
- Costanza, R., D'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., Van Den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- Cullen, J., Ciotti, A., Davis, R., Lewis, M., 1997. Emerging technologies and modeling. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1223–1239.
- Cullen, J., Franks, P., Karl, D., Longhurst, A., 2002. Physical influences on marine ecosystem dynamics, *The sea*.
- Cullen, J.J., MacIntyre, J.G., 1998. Behavior, physiology and the niche of depth-regulating phytoplankton. *Physiol. Ecol. Harmful Algal Bloom*.
- Culverhouse, P.F., 2007. Human and machine factors in algae monitoring performance. *Ecol. Inform.* 2, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2007.07.001>
- Culverhouse, P.F., Williams, R., Reguera, B., Herry, V., Gonzalez Gil, S., 2003. Do experts make mistakes? A comparison of human and machine labelling of dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 247, 17–25.
- d'Ovidio, F., Monte, S. De, Alvain, S., Dandonneau, Y., Lévy, M., 2010. Fluid dynamical niches of phytoplankton types. *PNAS* 107, 18366–18370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004620107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004620107>
- Da Silva, P.G., Hernández, M.I.M., 2014. Local and regional effects on community structure of dung beetles in a mainland-island scenario. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111883>
- da Silva, P.G., Medina Isabel, M.I., Heino, J., 2018. Disentangling the correlates of species and site contributions to beta diversity in dung beetle assemblages. *Divers. Distrib.* 24, 1674–

1686. <https://doi.org/10.1111/ddi.12785>

- Daniel, A., Laës-Huon, A., Barus, C., Beaton, A.D., Blandfort, D., Guigues, N., Knockaert, M., Muraron, D., Salter, I., Woodward, E.M.S., Greenwood, N., Achterberg, E.P., 2020. Toward a Harmonization for Using in situ Nutrient Sensors in the Marine Environment. *Front. Mar. Sci.* 6, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00773>
- De Monte, S., Soccodato, A., Alvain, S., D’Ovidio, F., 2013. Can we detect oceanic biodiversity hotspots from space? *ISME J.* 7, 2054–2056. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.72>
- Derot, J., Jamoneau, A., Teichert, N., Rosebery, J., Morin, S., Laplace-Treytore, C., 2020. Response of phytoplankton traits to environmental variables in French lakes: New perspectives for bioindication. *Ecol. Indic.* 108, 105659. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105659>
- Des Roches, S., Post, D.M., Turley, N.E., Bailey, J.K., Hendry, A.P., Kinnison, M.T., Schweitzer, J.A., Palkovacs, E.P., 2018. The ecological importance of intraspecific variation. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 57–64. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0402-5>
- Desmit, X., Ruddick, K., Lacroix, G., 2015. Salinity predicts the distribution of chlorophyll a spring peak in the southern North Sea continental waters. *J. Sea Res.* 103, 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2015.02.007>
- Diaz, R.J., 2001. Environmental Quality Overview of Hypoxia around the World. *J. Environ. Qual.* 30, 275–281.
- Díaz, S., Cabido, M., 2001. Vive la différence: Plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends Ecol. Evol.* 16, 646–655. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02283-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02283-2)
- Dolédec, S., Chessel, D., Gimaret-Carpentier, C., 2000. Niche separation in community analysis: A new method. *Ecology* 81, 2914–2927. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[2914:NSICAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[2914:NSICAA]2.0.CO;2)
- Downes-Tettmar, N., Rowland, S., Widdicombe, C., Woodward, M., Llewellyn, C., 2013. Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 53, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2012.10.011>
- Dubelaar, G.B.J., Geerders, P.J.F., Jonker, R.R., 2004. High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *J. Environ. Monit.* 6, 946–952. <https://doi.org/10.1039/b409350j>
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker, R.R., Tangen, K., 1999. Design and first results of CytoBuoy: A wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry* 37, 247–254.
- Dugenne, M., Thyssen, M., Nerini, D., Mante, C., Poggiale, J.C., Garcia, N., Garcia, F., Grégori, G.J., 2014. Consequence of a sudden wind event on the dynamics of a coastal phytoplankton community: An insight into specific population growth rates using a single cell high frequency approach. *Front. Microbiol.* 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00485>
- Edwards, K.F., Thomas, M.K., Klausmeier, C.A., Litchman, E., 2012. Allometric scaling and

- taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 57, 554–566. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.2.0554>
- Edwards, M., Reid, P., Planque, B., 2001. Long-term and regional variability of phytoplankton biomass in the Northeast Atlantic (1960-1995). *ICES J. Mar. Sci.* 58, 39–49. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0987>
- Egge, J.K., 1998. Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? *J. Mar. Syst.* 16, 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(97\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(97)00113-9)
- Eigemann, F., Schwartke, M., Schulz-Vogt, H., 2018. Niche separation of Baltic Sea cyanobacteria during bloom events by species interactions and autecological preferences. *Harmful Algae* 72, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.01.001>
- Elder, L., Olsson, P., 1985. Observations on diel migration of *Ceratium furca* and *Prorocentrum micans* in a stratified bay on the Swedish west coast, in: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam, pp. 195–200.
- Eloire, D., Somerfield, P.J., Conway, D.V.P., Halsband-Lenk, C., Harris, R., Bonnet, D., 2010. Temporal variability and community composition of zooplankton at station L4 in the Western Channel: 20 years of sampling. *J. Plankton Res.* 32, 657–679. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq009>
- Elton, C.S., 1927. *Animal ecology*. Sidgwick and Jackson, London.
- Evans, J.S.B.T., 1989. *Bias in human reasoning: Causes and consequences., Bias in human reasoning: Causes and consequences., Essays in cognitive psychology*. Lawrence Erlbaum Associates, Inc, Hillsdale, NJ, US.
- Fabbro, L.D., Duivenvoorden, L.J., 2000. A two-part model linking multidimensional environmental gradients and seasonal succession of phytoplankton assemblages. *Hydrobiologia* 438, 13–24. <https://doi.org/10.1023/A:1004153727140>
- Falkowski, P.G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.* 39, 235–258. <https://doi.org/10.1007/BF00014586>
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200–206. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Falkowski, P.G., Julie, L., 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27, 8–14.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305, 354–360. <https://doi.org/10.1126/science.1095964>
- Falkowski, P.G., Laws, E.A., Barber, R.T., Murray, J.W., 2003. Phytoplankton and Their Role in Primary, New, and Export Production, in: *Ocean Biogeochemistry*. pp. 99–121. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55844-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55844-3_5)

- Feistel, R., Nausch, G., Wasmund, N., 2008. State and evolution of the Baltic Sea, 1952–2005: a detailed 50-year survey of meteorology and climate, physics, chemistry, biology, and marine environment. John Wiley & Sons.
- Fernández-Delgado, M., Cernadas, E., Barro, S., Amorim, D., 2014. Do we need hundreds of classifiers to solve real world classification problems? *J. Mach. Learn. Res.* 15, 3133–3181. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.11.015020>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K.J., Quigg, A., Rees, T.A. V., Raven, J.A., 2010. Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *J. Plankton Res.* 32, 119–137. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp098>
- Finlay, B.J., 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296, 1061–1063. <https://doi.org/10.1126/science.1070710>
- Fistarol, G.O., Legrand, C., 2003. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255, 115–125.
- Flynn, D.F.B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B.T., Lin, B.B., Simpson, N., Mayfield, M.M., DeClerck, F., 2009. Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecol. Lett.* 12, 22–33. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01255.x>
- Fontana, S., Jokela, J., Pomati, F., 2014. Opportunities and challenges in deriving phytoplankton diversity measures from individual trait-based data obtained by scanning flow-cytometry. *Front. Microbiol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00324>
- Fontana, S., Petchey, O.L., Pomati, F., 2016. Individual-level trait diversity concepts and indices to comprehensively describe community change in multidimensional trait space. *Funct. Ecol.* 30, 808–818. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12551>
- Fontana, S., Thomas, M.K., Moldoveanu, M., Spaak, P., Pomati, F., 2018. Individual-level trait diversity predicts phytoplankton community properties better than species richness or evenness. *ISME J.* 12, 356–366. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.160>
- Fontana, S., Thomas, M.K., Reyes, M., Pomati, F., 2019. Light limitation increases multidimensional trait evenness in phytoplankton populations. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0320-9>
- Foulon, E., Not, F., Jalabert, F., Cariou, T., Massana, R., Simon, N., 2008. Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: Evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environ. Microbiol.* 10, 2433–2443. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01673.x>
- Fox, J.W., 2012. When should we expect microbial phenotypic traits to predict microbial abundances? *Front. Microbiol.* 3, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00268>
- Fragoso, G.M., Poulton, A.J., Pratt, N., Johnsen, G., Purdie, D.A., 2019. Trait-based analysis



- of subpolar North Atlantic phytoplankton and plastidic ciliate communities using automated flow cytometer. *Limnol. Oceanogr.* 64, 1–16. <https://doi.org/10.1002/lno.11189>
- Franks, P.J.S., Walstad, L.J., 1997. Phytoplankton patches at fronts: A model of formation and response to wind events. *J. Mar. Res.* 55, 1–28.
- Freedman, H.I., Waltman, P., 1977. Mathematical Models of Population Interactions with Dispersal. I: Stability of Two Habitats with and without a Predator. *SIAM J. Appl. Math.* 32, 631–648. <https://doi.org/10.1137/0132052>
- Furnas, M.J., 1991. Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 36, 13–29. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.1.0013>
- Garcia-soto, C., Fernández, E., Pingree, R.D., Harbour, D.S., 1995. Evolution and structure of a shelf coccolithophore bloom in the western English channel. *J. Plankton Res.* 17, 2011–2036. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.11.2011>
- Garcia-Soto, C., Pingree, R.D., 2009. Spring and summer blooms of phytoplankton (SeaWiFS/MODIS) along a ferry line in the Bay of Biscay and western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 29, 1111–1122. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2008.12.012>
- Gaston, K.J., Blackburn, T.M., 2007. Pattern and process in macroecology, *Pattern and Process in Macroecology*. <https://doi.org/10.1002/9780470999592>
- Gaston, K.J., Blackburn, T.M., Lawton, J.H., 1997. Interspecific Abundance-Range Size Relationships: An Appraisal of Mechanisms. *J. Anim. Ecol.* 66, 579. <https://doi.org/10.2307/5951>
- Gattuso, J.P., Frankignoulle, M., Wollast, R., 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 405–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.405>
- Gause, G.F., 1934. *The struggle for existence*. The Williams & Wilkins company, Baltimore. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4489>
- Genitsaris, S., Monchy, S., Breton, E., Lecuyer, E., Christaki, U., 2016. Small-scale variability of protistan planktonic communities relative to environmental pressures and biotic interactions at two adjacent coastal stations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 548, 61–75. <https://doi.org/10.3354/meps11647>
- Genitsaris, S., Monchy, S., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Ferreira, S., Christaki, U., 2015. Seasonal variations of marine protist community structure based on taxon-specific traits using the eastern English Channel as a model coastal system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–15. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv034>
- Gentilhomme, V., Lizon, F., 1997. Seasonal cycle of nitrogen and phytoplankton biomass in a well-mixed coastal system (Eastern English Channel). *Hydrobiologia* 361, 191–199. <https://doi.org/10.1023/A:1003134617808>
- Glibert, P.M., 2016. Margalef revisited : A new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions , including nutritional physiology. *Harmful Algae* 55, 25–30.

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.008>

- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. <https://doi.org/10.3354/meps08564>
- Gómez, F., Souissi, S., 2007. Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *J. Sea Res.* 58, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.08.002>
- González-Gil, S., Keafer, B.A., Jovine, R.V.M., Aguilera, A., Lu, S., Anderson, D.M., 1998. Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164, 21–35. <https://doi.org/10.3354/meps164021>
- Grattepanche, J.D., Breton, E., Brylinski, J.M., Lecuyer, E., Christaki, U., 2011. Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *J. Plankton Res.* 33, 37–50. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq097>
- Green, R.E., Sosik, H.M., Olson, R.J., 2003. Contributions of phytoplankton and other particles to inherent optical properties in New England continental shelf waters. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2377–2391. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.6.2377>
- Gregg, W.W., Conkright, M.E., Ginoux, P., O'Reilly, J.E., Casey, N.W., 2003. Ocean primary production and climate: Global decadal changes. *Geophys. Res. Lett.* 30, 10–13. <https://doi.org/10.1029/2003GL016889>
- Grinnell, J., 1917. The Niche-Relationships of the California Thrasher. *Auk* 34, 427–433.
- Groom, S., Martinez-Vicente, V., Fishwick, J., Tilstone, G., Moore, G., Smyth, T., Harbour, D., 2009. The Western English Channel observatory: Optical characteristics of station L4. *J. Mar. Syst.* 77, 278–295. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.12.015>
- Guiry, M.D., 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48, 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Guiselin, N., 2010. Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtière de la Manche orientale 237. <https://doi.org/10.1021/ie0712941>
- Häder, D.P., Gao, K., 2015. Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Front. Environ. Sci.* 3, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00014>
- Hair, J.F., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C., 1998. *Multivariate data analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Hajdu, S., Högländer, H., Larsson, U., 2007. Phytoplankton vertical distributions and composition in Baltic Sea cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 6, 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.006>
- Hällfors, H., Backer, H., Leppänen, J.M., Hällfors, S., Hällfors, G., Kuosa, H., 2013. The northern Baltic Sea phytoplankton communities in 1903-1911 and 1993-2005: A comparison of historical and modern species data. *Hydrobiologia* 707, 109–133.

<https://doi.org/10.1007/s10750-012-1414-4>

- Hamdi, I., Thyssen, M., Caniaux, G., Denis, M.J., 2013. Spatial distribution of ultraphytoplankton in the North East Atlantic (POMME study area) during Spring 2001. *J. Oceanogr. Res. Data* 5, 1–22.
- Haraguchi, L., Jakobsen, H.H., Lundholm, N., Carstensen, J., 2017. Monitoring natural phytoplankton communities: A comparison between traditional methods and pulse-shape recording flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* 80, 77–92. <https://doi.org/10.3354/ame01842>
- Hébert, P.-A., Poisson-Caillault, E., Wacquet, G., Artigas, L.F., Créach, V., Bonato, S., Thyssen, M., 2014. The DYMAPHY FCM clustering R-Toolbox.
- Heino, J., 2005. Positive relationship between regional distribution and local abundance in stream insects : a consequence of niche breadth or niche position ? *Ecography* 28, 345–354.
- Heino, J., de Mendoza, G., 2016. Predictability of stream insect distributions is dependent on niche position, but not on biological traits or taxonomic relatedness of species. *Ecography* 39, 1216–1226. <https://doi.org/10.1111/ecog.02034>
- Heino, J., Grönroos, M., 2017. Exploring species and site contributions to beta diversity in stream insect assemblages. *Oecologia* 183, 151–160. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3754-7>
- Heino, J., Grönroos, M., 2014. Untangling the relationships among regional occupancy, species traits, and niche characteristics in stream invertebrates. *Ecol. Evol.* 4, 1931–1942. <https://doi.org/10.1002/ece3.1076>
- Heino, J., Soininen, J., 2006. Regional occupancy in unicellular eukaryotes: A reflection of niche breadth, habitat availability or size-related dispersal capacity? *Freshw. Biol.* 51, 672–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01520.x>
- Heino, J., Tolonen, K.T., 2018. Ecological niche features override biological traits and taxonomic relatedness as predictors of occupancy and abundance in lake littoral macroinvertebrates. *Ecography* 41, 2092–2103. <https://doi.org/10.1111/ecog.03968>
- HELCOM, 2018. State of the Baltic Sea - Second HELCOM holistic assessment 2011-2016, in: *Baltic Sea Environment Proceedings*. p. 155.
- HELCOM, 2017. Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM [WWW Document]. [http://www.helcom.fi/Documents/Action\\_areas/Monitoring\\_assessment/Manuals\\_Guidel\\_Mar\\_Monit\\_Comb\\_Program\\_HELCOM.pdf](http://www.helcom.fi/Documents/Action_areas/Monitoring_assessment/Manuals_Guidel_Mar_Monit_Comb_Program_HELCOM.pdf). URL <https://helcom.fi/action-areas/monitoring-and-assessment/monitoring-guidelines/> (accessed 2.22.20).
- HELCOM, 2002. Environment of the Baltic Sea, 1994 - 1998, in: *Baltic Sea Environment Proceedings*, Vol 82B. pp. 1–215.
- Herlemann, D.P.R., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the

- Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
- Hernández Fariñas, T., Bacher, C., Soudant, D., Belin, C., Barillé, L., 2015. Assessing phytoplankton realized niches using a French national phytoplankton monitoring network. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 159, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.03.010>
- Hoch, T., Garreau, P., 1998. Phytoplankton dynamics in the English Channel: A simplified three-dimensional approach. *J. Mar. Syst.* 16, 133–150. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(97\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(97)00103-6)
- Holligan, P., Harris, R., Newell, R., Harbour, D., Head, R., Linley, E., Lucas, M., Tranter, P., Weekley, C., 1984. Vertical distribution and partitioning of organic carbon in mixed, frontal and stratified waters of the English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 14, 111–127. <https://doi.org/10.3354/meps014111>
- Holligan, P.M., Groom, S.B., Harbour, D.S., 1993. What controls the distribution of the coccolithophore, *Emiliana huxleyi*, in the North Sea? *Fish. Oceanogr.* 2, 175–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.1993.tb00133.x>
- Holligan, P.M., Harbour, D.S., 1977. The vertical distribution and succession of phytoplankton in the western English Channel in 1975 and 1976. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 57, 1075–1093. <https://doi.org/10.1017/S002531540002614X>
- Holligan, P.M., Viollier, M., Harbour, D.S., Camus, P., Champagne-Philippe, M., 1983. Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature* 304, 339–342. <https://doi.org/10.1038/304339a0>
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D., A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Houghton, S.D., 1988. Thermocline control on coccolith diversity and abundance in Recent sediments from the Celtic Sea and English Channel. *Mar. Geol.* 83, 313–319. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(88\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0025-3227(88)90065-5)
- Houliet, E., Lizon, F., Artigas, L.F., Lefebvre, S., Schmitt, F.G., 2013. Spatio-temporal variability of phytoplankton photosynthetic activity in a macrotidal ecosystem (the Strait of Dover, eastern English Channel). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 129, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.06.009>
- Houliet, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., 2012a. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: An application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.* 34, 136–151. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr091>
- Houliet, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., 2012b. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: An application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.* 34, 136–151. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr091>
- Houliet, E., Simis, S., Nenonen, S., Ylöstalo, P., Seppälä, J., 2017. Basin-scale spatio-temporal

- variability and control of phytoplankton photosynthesis in the Baltic Sea: The first multiwavelength fast repetition rate fluorescence study operated on a ship-of-opportunity. *J. Mar. Syst.* 169, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2017.01.007>
- Hu, Y.O.O., Karlson, B., Charvet, S., Andersson, A.F., 2016. Diversity of pico- to mesoplankton along the 2000 km salinity gradient of the baltic sea. *Front. Microbiol.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00679>
- Hutchinson, G.E., 1961. The paradox of plankton. *Am. Nat.* XCV, 137–145.
- Hutchinson, G.E., 1959. Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? *Am. Nat.* 93, 145–159.
- Hutchinson, G.E., 1957. Cold spring harbor symposium on quantitative biology. Concluding remarks 22, 415–427.
- Hydes, D., Aoyama, M., Aminot, A., Bakker, K., Becker, S., Coverly, S., Daniel, A., Dickson, A.G., Grosso, O., Kerouel, R., van Ooijen, J., Sato, K., Tanhua, T., Woodward, E.M.S., Zhang, J.Z., 2010. Determination of dissolved nutrients (N, P, Si) in seawater with high precision and inter-comparability using gas-segmented continuous flow analysers, The GO-SHIP Repeat Hydrography Manual IOCCP Report. Paris.
- Hydes, D.J., Wright, P.N., 1999. SONUS: The southern nutrients study 1995-1997. Rep. Southampton. Oceanogr. Cent.
- Iriarte, A., Purdie, D.A., 2004. Factors controlling the timing of major spring bloom events in an UK south coast estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.08.002>
- Irwin, A.J., Finkel, Z. V., 2017. Phytoplankton functional types: a trait perspective. *bioRxiv* 1–34. <https://doi.org/10.1101/148312>
- Irwin, A.J., Nelles, A.M., Finkel, Z. V., 2012. Phytoplankton niches estimated from field data. *Limnol. Oceanogr.* 57, 787–797. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.3.0787>
- Johnson, R.H., 1910. Determinate evolution in the color-pattern of the lady-beetles. Carnegie Institution of Washington. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.30902>
- Jouandet, M.P., Petit, L., Wacquet, G., Dédécker, C., Aubert, A., Rombouts, I., Mialet, B., Lebourg, E., Bruaut, M., Gómez, F., Delarbre, J., Cornille, V., Lécuyer, E., Didry, M., Nowaszyck, A., Duflos, M., Artigas, L.F., 2019. Mise en oeuvre du Programme de Surveillance “Habitats Pélagiques” : test de mise en place des campagnes saisonnières sur le site atelier Manche Mer du Nord et Mers Celtiques.
- Jouenne, F., Lefebvre, S., Véron, B., Lagadeuc, Y., 2007. Phytoplankton community structure and primary production in small intertidal estuarine-bay ecosystem (eastern English Channel, France). *Mar. Biol.* 151, 805–825. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0440-z>
- Kahru, M., Horstmann, U., Rud, O., 1994. Satellite detection of increased cyanobacteria blooms in the Baltic Sea: Natural fluctuation or ecosystem change? *Ambio* 23, 469–472. <https://doi.org/10.2307/4314262>

- Kahru, M., Savchuk, O.P., Elmgren, R., 2007. Satellite measurements of cyanobacterial bloom frequency in the Baltic Sea: Interannual and spatial variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 343, 15–23. <https://doi.org/10.3354/meps06943>
- Karasiewicz, S., Breton, E., Lefebvre, A., Hernández, T., 2018. Realized niche analysis of phytoplankton communities involving HAB : *Phaeocystis* spp . as a case study. *Harmful Algae* 72, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.12.005>
- Karasiewicz, S., Dolédec, S., Lefebvre, S., 2017. Within outlying mean indexes: refining the OMI analysis for the realized niche decomposition. *PeerJ* 5, e3364. <https://doi.org/10.7717/peerj.3364>
- Karlson, B., Andersson, L.S., Kaitala, S., Kronsell, J., Mohlin, M., Seppälä, J., Willstrand Wranne, A., 2016. A comparison of FerryBox data vs. monitoring data from research vessels for near surface waters of the Baltic Sea and the Kattegat. *J. Mar. Syst.* 162, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2016.05.002>
- Karp-Boss, L., Boss, E., Jumars P.A, 1996. Nutrient Fluxes to Planktonic Osmotrophs in the Presence of Fluid Motion. *Oceanogr. Mar. Biol. an Annu. Rev.* 34, 71–107.
- Kavanaugh, M.T., Oliver, M.J., Chavez, F.P., Letelier, R.M., Muller-Karger, F.E., Doney, S.C., 2016. Seascapes as a new vernacular for pelagic ocean monitoring, management and conservation. *ICES J. Mar. Sci.* 73, 1839–1850. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw086>
- Kifle, D., Purdie, D.A., 1993. The seasonal abundance of the phototrophic ciliate *Mesodinium rubrum* in Southemptom water, England. *J. Plankton Res.* 5, 823–833.
- Kirk, J.T.O., 2011. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, Third edit. ed. Cambridge University Press.
- Klais, R., Tamminen, T., Kremp, A., Spilling, K., Olli, K., 2011. Decadal-scale changes of Dinoflagellates and Diatoms in the Anomalous Baltic Sea spring bloom. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021567>
- Kraft, N.J.B., Ackerly, D.D., 2010. Functional trait and phylogenetic tests of community assembly across spatial scales in an Amazonian forest. *Ecol. Monogr.* 80, 401–422. <https://doi.org/10.1890/09-1672.1>
- Kraft, N.J.B., Valencia, R., Ackerly, D.D., 2008. Functional traits and niche-based tree community assembly in an Amazonian forest. *Science* 322, 580–582. <https://doi.org/10.1126/science.1160662>
- Krasnov, B.R., Shenbrot, G.I., Warburton, E.M., Van Der Mescht, L., Surkova, E.N., Medvedev, S.G., Pechnikova, N., Ermolova, N., Kotti, B.K., Khokhlova, I.S., 2019. Species and site contributions to  $\beta$ -diversity in fleas parasitic on the Palearctic small mammals: Ecology, geography and host species composition matter the most. *Parasitology* 146, 653–661. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001944>
- Kruk, C., 2002. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *J. Plankton Res.* 24, 901–912. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.9.901>

- Kullenberg, G., 1981. Physical Oceanography, in: *The Baltic Sea*. pp. 135–181.
- Lacroix, G., Ruddick, K., Gypens, N., Lancelot, C., 2007. Modelling the relative impact of rivers (Scheldt/Rhine/Seine) and Western Channel waters on the nutrient and diatoms/Phaeocystis distributions in Belgian waters (Southern North Sea). *Cont. Shelf Res.* 27, 1422–1446. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.01.013>
- Lacroix, G., Ruddick, K., Ozer, J., Lancelot, C., 2004. Modelling the impact of the Scheldt and Rhine/Meuse plumes on the salinity distribution in Belgian waters (southern North Sea). *J. Sea Res.* 52, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2004.01.003>
- Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H., Taylor, B.E., 1986. Phytoplankton control by zooplankton: a study on the clear water phase. *Limnol. Ocean.* 31, 478–490.
- Lampert, Winfried, Fleckner, W., Rai, H., Taylor, B.E., 1986. Phytoplankton control by grazing zooplankton: A study on the spring clear-water phase. *Limnol. Oceanogr.* 31, 478–490. <https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.3.0478>
- Lamy, D., Obernosterer, I., Laghdass, M., Artigas, L.F., Breton, E., Grattepanche, J.D., Lecuyer, E., Degros, N., Lebaron, P., Christaki, U., 2009. Temporal changes of major bacterial groups and bacterial heterotrophic activity during a *Phaeocystis globosa* bloom in the eastern English Channel. *Aquat. Microb. Ecol.* 58, 95–107. <https://doi.org/10.3354/ame01359>
- Lancelot, C., Billen, G., Sournia, A., Weisse, T., Colijn, F., Veldhuis, M.J.W., Davies, A., Wassmann, P., 1987. *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the continental coastal zones of the North Sea. *Ambio* 16, 38–46.
- Lancelot, C., Passy, P., Gypens, N., 2014. Model assessment of present-day *Phaeocystis* colony blooms in the Southern Bight of the North Sea (SBNS) by comparison with a reconstructed pristine situation. *Harmful Algae* 37, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.017>
- Landeira, J.M., Ferron, B., Lunven, M., Morin, P., Marie, L., Sourisseau, M., 2014. Biophysical interactions control the size and abundance of large phytoplankton chains at the ushant tidal front. *PLoS One* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090507>
- Larsson, K., Hajdu, S., Kilpi, M., Larsson, R., Leito, A., Lyngs, P., 2014. Effects of an extensive *Prymnesium polylepis* bloom on breeding eiders in the Baltic Sea. *J. Sea Res.* 88, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.12.017>
- Larsson, U., Hajdu, S., Walve, J., Elmgren, R., 2001. Baltic Sea nitrogen fixation estimated from the summer increase in upper mixed layer total nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 46, 811–820. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.4.0811>
- Lavorel, S., Garnier, E., 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct. Ecol.* 16, 545–556. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x>
- Leakey, R.J.G., Burkill, P.H., Sleight, M.A., 1992. Planktonic ciliates in Southampton Water: abundance, biomass, production, and role in pelagic carbon flow. *Mar. Biol.* 114, 67–83. <https://doi.org/10.1038/470444a>

- Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, F.L., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992-2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 68, 2029–2043. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsr149>
- Lefebvre, A., Poisson-Caillault, E., 2019. High resolution overview of phytoplankton spectral groups and hydrological conditions in the eastern English Channel using unsupervised clustering. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 608, 73–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/meps12781>
- Legendre, L., Courties, C., Troussellier, M., 2001. Flow cytometry in oceanography 1989-1999: Environmental challenges and research trends. *Cytometry* 44, 164–172. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010701\)44:3<164::AID-CYTO1108>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010701)44:3<164::AID-CYTO1108>3.0.CO;2-6)
- Legendre, P., 2019. Spatial and temporal analysis of beta diversity in the Barro Colorado Island forest dynamics plot, Panama. *For. Ecosyst.* 6, 1–11.
- Legendre, P., De Cáceres, M., 2013. Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecol. Lett.* <https://doi.org/10.1111/ele.12141>
- Legendre, P., Gauthier, O., 2014. Statistical methods for temporal and space-time analysis of community composition data. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2728>
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. Second English edition, Elsevier Science B. V. Amsterdam.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical ecology*. 2nd. Elsevier Sci. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lehtinen, S., Tamminen, T., Ptacnik, R., Andersen, T., 2017. Phytoplankton species richness, evenness, and production in relation to nutrient availability and imbalance. *Limnol. Oceanogr.* 62, 1393–1408. <https://doi.org/10.1002/lno.10506>
- Leibold, M.A., 1995. The niche concept revisited: mechanistic models and community context. *Ecology* 76, 1371–1382. <https://doi.org/10.2307/1938141>
- Lévy, M., Jahn, O., Dutkiewicz, S., Follows, M.J., 2014. Phytoplankton diversity and community structure affected by oceanic dispersal and mesoscale turbulence. *Limnol. Oceanogr. Fluids Environ.* 4, 67–84. <https://doi.org/10.1215/21573689-2768549>
- Li, W.K.W., Dickie, P.M., 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry* 44, 236–246.
- Li, W.K.W., Zohary, T., Yacobi, Y.Z., Wood, A.M., 1993. Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102, 79–87.
- Liefer, J.D., MacIntyre, H.L., Novoveská, L., Smith, W.L., Dorsey, C.P., 2009. Temporal and spatial variability in *Pseudo-nitzschia* spp. in Alabama coastal waters: A “hot spot” linked



- to submarine groundwater discharge? *Harmful Algae* 8, 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.003>
- Lips, U., Lips, I., 2014. Bimodal distribution patterns of motile phytoplankton in relation to physical processes and stratification (Gulf of Finland, Baltic Sea). *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 101, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.05.029>
- Lips, U., Lips, I., Liblik, T., Kikas, V., Altoja, K., Buhhalko, N., Rünk, N., 2011. Vertical dynamics of summer phytoplankton in a stratified estuary (Gulf of Finland, Baltic Sea). *Ocean Dyn.* 61, 903–915. <https://doi.org/10.1007/s10236-011-0421-8>
- Litchman, E., 2007. Resource Competition and the Ecological Success of Phytoplankton, in: Falkowski, P.G., Knoll, A.H. (Eds.), *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Academic Press, pp. 351–375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370518-1.X5000-0>
- Litchman, E., de Tezanos Pinto, P., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K., 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* 653, 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0341-5>
- Litchman, E., Edwards, K.F., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., 2012. Phytoplankton niches, traits and eco-evolutionary responses to global environmental change. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 235–248. <https://doi.org/10.3354/meps09912>
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., 2008. Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39, 615–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173549>
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: Scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol. Lett.* 10, 1170–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01117.x>
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Yoshiyama, K., 2009. Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2665–2670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810891106>
- Long, J.D., Smalley, G.W., Barsby, T., Anderson, J.T., Hay, M.E., 2007. Chemical cues induce consumer-specific defenses in a bloom-forming marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 10512–10517.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., Huston, M.A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D.A., 2001. Ecology: Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* 294, 804–808. <https://doi.org/10.1126/science.1064088>
- Louchart, A., Lizon, F., Lefebvre, A., Didry, M., Schmitt, F.G., Artigas, L.F., 2020. Phytoplankton distribution from Western to Central English Channel, revealed by automated flow cytometry during the summer-fall transition. *Cont. Shelf Res.* 195. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2020.104056>
- Lovejoy, S., Currie, W.J.S., Tessier, Y., Claereboudt, M.R., Bourget, E., Roff, J.C., Schertzer, D., 2001. Universal multifractals and ocean patchiness: phytoplankton, physical fields and

- coastal heterogeneity. *J. Plankton Res.* 23, 117–141. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.2.117>
- Lund-Hansen, L.C., 2004. Diffuse attenuation coefficients  $K_d(\text{PAR})$  at the estuarine North Sea-Baltic Sea transition: Time-series, partitioning, absorption, and scattering. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.05.004>
- Łysiak-Pastuszak, E., Bartoszewicz, M., Bradtke, K., Darecki, M., Drgas, N., Kowalczyk, P., Kraśniewski, W., Krezel, A., Krzymiński, W., Lewandowski, Ł., Mazur-Marzec, H., Piliczewski, B., Sagan, S., Sutryk, K., Witek, B., 2012. A study of episodic events in the Baltic Sea - Combined in situ and satellite observations. *Oceanologia* 54, 121–141. <https://doi.org/10.5697/oc.54-2.121>
- Machado, K.B., Borges, P.P., Carneiro, F.M., de Santana, J.F., Vieira, L.C.G., de Moraes Huszar, V.L., Nabout, J.C., 2015. Using lower taxonomic resolution and ecological approaches as a surrogate for plankton species. *Hydrobiologia* 743, 255–267. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2042-y>
- Mackey, M.D., Mackey, D.J., Higgins, H.W., Wright, S.W., 1996. CHEMTAX - A program for estimating class abundances from chemical markers: Application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144, 265–283. <https://doi.org/10.3354/meps144265>
- Mahadevan, A., D'Asaro, E., Lee, C., Perry, M.J., 2012. Eddy-Driven Stratification Initiates North Atlantic Spring Phytoplankton Blooms. *Science* 337, 54–58.
- Malkassian, A., Nerini, D., Van Dijk, M.A., Thyssen, M., Mante, C., Gregori, G., 2011. Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer. *Cytom. Part A* 79 A, 263–275. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21035>
- Marañón, E., 2015. Cell Size as a Key Determinant of Phytoplankton Metabolism and Community Structure. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 241–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015955>
- Margalef, Ramon, 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. acta* 1, 493–509. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352000000400008>
- Margalef, Ramón, 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternative in an unstable environment. *Oceanologica* 1, 493–509.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186–193. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>
- Marie, D., Shi, X.L., Rigaut-Jalabert, F., Vaultot, D., 2010. Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 165–178. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00842.x>
- Marino, N.A.C., Céréghino, R., Gilbert, B., Petermann, J.S., Srivastava, D.S., de Omena, P.M., Bautista, F.O., Guzman, L.M., Romero, G.Q., Trzcinski, M.K., Barberis, I.M., Corbara,

- B., Debastiani, V.J., Dézerald, O., Kratina, P., Leroy, C., MacDonald, A.A.M., Montero, G., Pillar, V.D., Richardson, B.A., Richardson, M.J., Talaga, S., Gonçalves, A.Z., Piccoli, G.C.O., Jocqué, M., Farjalla, V.F., 2020. Species niches, not traits, determine abundance and occupancy patterns: A multi-site synthesis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 29, 295–308. <https://doi.org/10.1111/geb.13029>
- Marrec, P., Cariou, T., Collin, E., Durand, A., Latimier, M., Macé, E., Morin, P., Raimund, S., Vernet, M., Bozec, Y., 2013. Seasonal and latitudinal variability of the CO<sub>2</sub> system in the western English Channel based on Voluntary Observing Ship ( VOS ) measurements. *Mar. Chem.* 155, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2013.05.014>
- Marrec, P., Cariou, T., Latimier, M., Macé, E., Morin, P., Vernet, M., Bozec, Y., 2014. Spatio-temporal dynamics of biogeochemical processes and air – sea CO<sub>2</sub> fluxes in the Western English Channel based on two years of FerryBox deployment. *J. Mar. Syst.* 140, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.05.010>
- Marrec, P., Doglioli, A.M., Grégori, G., Dugenne, M., Della Penna, A., Bhairy, N., Cariou, T., Hélias Nunige, S., Lahbib, S., Rougier, G., Wagener, T., Thyssen, M., 2018. Coupling physics and biogeochemistry thanks to high-resolution observations of the phytoplankton community structure in the northwestern Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 15, 1579–1606. <https://doi.org/10.5194/bg-15-1579-2018>
- Martin, A.P., Zubkov, M. V., Burkill, P.H., Holland, R.J., 2005. Extreme spatial variability in marine picoplankton and its consequences for interpreting Eulerian time-series. *Biol. Lett.* 1, 366–369. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0316>
- McManus, M.A., Woodson, C.B., 2012. Plankton distribution and ocean dispersal. *J. Exp. Biol.* 215, 1008–1016. <https://doi.org/10.1242/jeb.059014>
- McQuatters-Gollop, A., Atkinson, A., Aubert, A., Bedford, J., Best, M., Bresnan, E., Cook, K., Devlin, M., Gowen, R., Johns, D.G., Machairopoulou, M., McKinney, A., Mellor, A., Ostle, C., Scherer, C., Tett, P., 2019. Plankton lifeforms as a biodiversity indicator for regional-scale assessment of pelagic habitats for policy. *Ecol. Indic.* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.02.010>
- McQuatters-Gollop, A., Edwards, M., Helaouët, P., Johns, D.G., Owens, N.J.P., Raitzos, D.E., Schroeder, D., Skinner, J., Stern, R.F., 2015. The Continuous Plankton Recorder survey: How can long-term phytoplankton datasets contribute to the assessment of Good Environmental Status? *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 162, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.010>
- Mena, C., Reglero, P., Hidalgo, M., Sintés, E., Santiago, R., Martín, M., Moyà, G., Balbín, R., 2019. Phytoplankton community structure is driven by stratification in the oligotrophic mediterranean sea. *Front. Microbiol.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01698>
- Ménesguen, A., Gohin, F., 2006. Observation and modelling of natural retention structures in the English Channel. *J. Mar. Syst.* 63, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2006.05.004>
- Ménesguen, A., Hoch, T., 1997. Modelling the biogeochemical cycles of elements limiting primary production in the English Channel. I. Role of thermohaline stratification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146, 173–188.

- Millie, D.F., Schofield, O.M., Kirkpatrick, G.J., Johnsen, G., Tester, P.A., Vinyard, B.T., 1997. Detection of harmful algal blooms using photopigments and absorption signatures: A case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1240–1251.
- Milliman, J.D., Farnsworth, K.L., 2013. *River Discharge to the Coastal Ocean: A global synthesis*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511781247>
- Mills, D.K., Greenwood, N., Kröger, S., Devlin, M., Sivyer, D.B., Pearce, D., Cutchey, S., Malcolm, S.J., 2005. New approaches to improve the detection of eutrophication in UK coastal waters, in: 2004 USA-Baltic International Symposium. pp. 36–42. <https://doi.org/10.1109/BALTIC.2004.7296835>
- Monchy, S., Grattepanche, J.D., Breton, E., Meloni, D., Sancier, G., Chabé, M., Delhaes, L., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Christaki, U., 2012. Microplanktonic community structure in a coastal system relative to a *Phaeocystis* bloom inferred from morphological and tag pyrosequencing methods. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039924>
- Moutier, W., Duforêt-Gaurier, L., Thyssen, M., Loisel, H., Mériaux, X., Courcot, L., Dessailly, D., Alvain, S., 2016. Scattering of individual particles from cytometry: tests on phytoplankton cultures. *Opt. Express* 24, 24188. <https://doi.org/10.1364/oe.24.024188>
- Moutier, W., Duforêt-Gaurier, L., Thyssen, M., Loisel, H., Mériaux, X., Courcot, L., Dessailly, D., Rêve, A.H., Grégori, G., Alvain, S., Barani, A., Brutier, L., Dugenne, M., 2017. Evolution of the scattering properties of phytoplankton cells from flow cytometry measurements. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181180>
- Mouw, C.B., Hardman-Mountford, N.J., Alvain, S., Bracher, A., Brewin, R.J.W., Bricaud, A., Ciotti, A.M., Devred, E., Fujiwara, A., Hirata, T., Hirawake, T., Kostadinov, T.S., Roy, S., Uitz, J., 2017. A Consumer's Guide to Satellite Remote Sensing of Multiple Phytoplankton Groups in the Global Ocean. *Front. Mar. Sci.* 4, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00041>
- Muylaert, K., Gonzales, R., Franck, M., Lionard, M., Van der Zee, C., Cattrijsse, A., Sabbe, K., Chou, L., Vyverman, W., 2006. Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. *J. Sea Res.* 55, 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2005.12.002>
- Naeem, S., Wright, J.P., 2003. Disentangling biodiversity effects on ecosystem functioning: Deriving solutions to a seemingly insurmountable problem. *Ecol. Lett.* 6, 567–579. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00471.x>
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Claquin, P., 2013. Study of dynamics of phytoplankton and photosynthetic parameters using opportunity ships in the western English Channel. *J. Mar. Syst.* 128, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2013.04.019>
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., Claquin, P., 2014. Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 505, 49–64. <https://doi.org/10.3354/meps10772>

- Napoléon, C., Raimbault, V., Fiant, L., Riou, P., Lefebvre, S., Lampert, L., Claquin, P., 2012. Spatiotemporal dynamics of physicochemical and photosynthetic parameters in the central English Channel. *J. Sea Res.* 69, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.01.005>
- Nordberg, K., 1991. Oceanography in the Kattegat and Skagerrak over the past 8000 years. *Paleoceanography* 6, 461–484.
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaultot, D., Simon, N., 2004. A Single Species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), Dominates the Eukaryotic Picoplankton in the Western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4064–4072. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4064>
- Olli, K., 1999. Diel vertical migration of phytoplankton and heterotrophic flagellates in the Gulf of Riga. *J. Mar. Syst.* 23, 145–163. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(99\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(99)00055-X)
- Olli, K., Heiskanen, A.-S., Lohikari, K., 1998. Vertical migration of autotrophic microorganisms during a vernal bloom at the coastal Baltic Sea --- coexistence through niche separation, in: Tamminen, T., Kuosa, H. (Eds.), *Eutrophication in Planktonic Ecosystems: Food Web Dynamics and Elemental Cycling: Proceedings of the Fourth International PELAG Symposium, Held in Helsinki, Finland, 26--30 August 1996*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 179–189. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1493-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1493-8_14)
- Olli, K., Seppälä, J., 2001. Vertical niche separation of phytoplankton: Large-scale mesocosm experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 217, 219–233. <https://doi.org/10.3354/meps217219>
- Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Altabet, M.A., Dusenberry, J.A., 1990. Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part A, Oceanogr. Res. Pap.* 37, 1033–1051. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(90\)90109-9](https://doi.org/10.1016/0198-0149(90)90109-9)
- Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Armbrust, E. V., 1988. Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep Sea Res. Part A, Oceanogr. Res. Pap.* 35, 425–440. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0198-0149(88)90019-2)
- Olson, R.J., Zettler, E.R., Anderson, O.K., 1989. Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry* 10, 636–643. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100520>
- Olsson, P., Edler, L., 1991. Dinoflagellate distribution in the southeastern Kattegat during an autumn bloom. *Sarsia* 76, 23–28. <https://doi.org/10.1080/00364827.1991.10413462>
- Owen, K.R., 2014. Flow cytometric investigation of the size spectrum of North Sea phytoplankton communities. University of East Anglia.
- Pančić, M., Kiørboe, T., 2018. Phytoplankton defence mechanisms: traits and trade-offs. *Biol. Rev.* 93, 1269–1303. <https://doi.org/10.1111/brv.12395>
- Pannard, A., Claquin, P., Klein, C., Le Roy, B., Véron, B., 2008a. Short-term variability of the phytoplankton community in coastal ecosystem in response to physical and chemical conditions' changes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 80, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.08.008>

- Pannard, A., Clauquin, P., Klein, C., Le Roy, B., Véron, B., 2008b. Short-term variability of the phytoplankton community in coastal ecosystem in response to physical and chemical conditions ' changes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 80, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.08.008>
- Parsons, M.L., Dortch, Q., Doucette, G.J., 2013. An assessment of Pseudo-nitzschia population dynamics and domoic acid production in coastal Louisiana. *Harmful Algae* 30, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.09.001>
- Pearl, H.W., Valdes-Weaver, L.M., Joyner, A.R., Winkelmann, V., 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Pamlico sound system, North Carolina. *Ecol. Appl.* 17, 88–101.
- Peeters, J.C.H., Haas, H., Peperzak, L., Wetsteyn, L.P.M.J., 1991. Limiting factors for phytoplankton in the North Sea. *Water Sci. Technol.* 24, 261–267.
- Pellerin, B.A., Stauffer, B.A., Young, D.A., Sullivan, D.J., Bricker, S.B., Walbridge, M.R., Clyde, G.A., Shaw, D.M., 2016. Emerging Tools for Continuous Nutrient Monitoring Networks: Sensors Advancing Science and Water Resources Protection. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 52, 993–1008. <https://doi.org/10.1111/1752-1688.12386>
- Peperzak, L., 1993. Daily irradiance governs growth rate and colony formation of Phaeocystis (Prymnesiophyceae). *J. Plankton Res.* 15, 809–821. <https://doi.org/10.1093/plankt/15.7.809>
- Pereira, G.C., Figueiredo, A.R., Ebecken, N.F.F., 2018. Using in situ flow cytometry images of ciliates and dinoflagellates for aquatic system monitoring. *Brazilian J. Biol.* 78, 240–247.
- Perruche, C., Pondaven, P., Lapeyre, G., Rivière, P., Carton, X., 2011. Effects of surface quasi-geostrophic turbulence on phytoplankton competition and coexistence. *J. Mar. Res.* 69, 105–135. <https://doi.org/10.1357/002224011798147606>
- Petchey, O.L., Gaston, K.J., 2006. Functional diversity: Back to basics and looking forward. *Ecol. Lett.* 9, 741–758. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00924.x>
- Petersen, W., 2014. FerryBox systems: State-of-the-art in Europe and future development. *J. Mar. Syst.* 140, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.07.003>
- Petersen, W., Ove Möller, K., 2017. Report on the status of sensors used for measuring nutrients, biology-related optical properties, variables of the marine carbonate system, and for coastal profiling, within the JERICO network and, more generally, in the European context, Joint European R.
- Picheral, M., Guidi, L., Stemmann, L., Karl, D.M., Iddaoud, G., Gorsky, G., 2010. The underwater vision profiler 5: An advanced instrument for high spatial resolution studies of particle size spectra and zooplankton. *Limnol. Oceanogr. Methods* 8, 462–473. <https://doi.org/10.4319/lom.2010.8.462>
- Pingree, R.D., 1980. Physical Oceanography of the Celtic Sea and English Channel, in: Banner, F.T., Collins, M.B., Massie, K.S. (Eds.), *The North-West European Shelf Seas: The Sea Bed and the Sea in Motion II. Physical and Chemical Oceanography, and Physical Resources*. pp. 415–465. [https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(08\)71358-8](https://doi.org/10.1016/S0422-9894(08)71358-8)

- Pingree, R.D., Griffiths, D.K.G., 1978. Tidal Fronts on the Shelf Seas Around the British Isles Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth, England. *J. Geophys. Res. Ocean.* 83, 4615–4622. <https://doi.org/10.1029/JC083iC09p04615>
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Head, R.N., 1977. Survival of dinoflagellates blooms in the western English Channel. *Nature* 265, 266–269. <https://doi.org/10.1038/266309a0>
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Mardell, G.T., 1979. Phytoplankton growth and cyclonic eddies. *Nature* 278, 245–247.
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Mardell, G.T., 1978. The effects of vertical stability on phytoplankton distributions in the summer on the northwest European Shelf. *Deep-Sea Res.* 25, 1011–1028. [https://doi.org/10.1016/0146-6291\(78\)90584-2](https://doi.org/10.1016/0146-6291(78)90584-2)
- Pingree, R.D., Maddock, L., 1977. Tidal residuals in the English Channel. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 57, 339–354. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0025315400021792>
- Pingree, R.D., Pugh, P.R., Holligan, P.M., Forster, G.R., 1975. Summer phytoplankton blooms and red tides along tidal fronts in the approaches to the English Channel. *Nature* 258, 672–677. <https://doi.org/10.1038/253600a0>
- Plant, J.N., Johnson, K.S., Needoba, J.A., Coletti, L.J., 2009. NH<sub>4</sub>-Digiscan: an in situ and laboratory ammonium analyzer for estuarine, coastal, and shelf waters. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7, 144–156. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.144>
- Ploug, H., 2008. Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon* sp. and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: Small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnol. Oceanogr.* 53, 914–921. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0914>
- Pomati, F., Jokela, J., Simona, M., Veronesi, M., Ibelings, B.W., 2011. An automated platform for phytoplankton ecology and aquatic ecosystem monitoring. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9658–9665. <https://doi.org/10.1021/es201934n>
- Pomati, F., Kraft, N.J.B., Posch, T., Eugster, B., Jokela, J., Ibelings, B.W., 2013. Individual Cell Based Traits Obtained by Scanning Flow-Cytometry Show Selection by Biotic and Abiotic Environmental Factors during a Phytoplankton Spring Bloom. *PLoS One* 8, e71677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071677>
- Pomati, F., Nizzetto, L., 2013. Assessing triclosan-induced ecological and trans-generational effects in natural phytoplankton communities: A trait-based field method. *Ecotoxicology* 22, 779–794. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1068-7>
- Prairie, J.C., Sutherland, K.R., Nickols, K.J., Kaltenberg, A.M., 2012. Biophysical interactions in the plankton: A cross-scale review. *Limnol. Oceanogr. Fluids Environ.* 2, 121–145. <https://doi.org/10.1215/21573689-1964713>
- Preddy, W.S., 1954. The mixing and movement of water in the estuary of the Thames. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 33, 645–662. <https://doi.org/10.1017/S0025315400026928>
- Prins, T.C., Desmit, X., Baretta-Bekker, J.G., 2012. Phytoplankton composition in Dutch coastal waters responds to changes in riverine nutrient loads. *J. Sea Res.* 73, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.06.009>

- Ptacek, R., Solimini, A.G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepistö, L., Willén, E., Rekolainen, S., 2008. Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5134–5138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708328105>
- Pulliam, H.R., 2000. On the relationship between niche and distribution. *Ecol. Lett.* 3, 349–361.
- Quisthoudt, C., 1987. Primary production in Dover Strait (France): Spatio-temporal variations off Cap Griz-Nez. *Comptes rendus l'Académie des Sci. Paris* 10, 245–250.
- Rabalais, N.N., Díaz, R.J., Levin, L.A., Turner, R.E., Gilbert, D., Zhang, J., 2010. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences* 7, 585–619. <https://doi.org/10.5194/bg-7-585-2010>
- Rachik, S., Christaki, U., Li, L.L., Genitsaris, S., Breton, E., Monchy, S., 2018. Diversity and potential activity patterns of planktonic eukaryotic microbes in a mesoeutrophic coastal area (eastern English Channel). *PLoS One* 13, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196987>
- Randin, C.F., Dullinger, S., Dirnböck, T., Zimmermann, N.E., Zappa, M., Guisan, A., 2006. Are niche-based species distribution models transferable in space? *J. Biogeogr.* 33, 1689–1703. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01466.x>
- Rantajärvi, E., Gran, V., Hällfors, S., Olsonen, R., 1997. Effects of environmental factors on the phytoplankton community in the Gulf of Finland - Unattended high frequency measurements and multivariate analyses. *Hydrobiologia* 363, 127–139. <https://doi.org/10.1023/A:1003134007639>
- Rantajärvi, E., Olsonen, R., Hällfors, S., Leppänen, J.M., Raateoja, M., 1998. Effect of sampling frequency on detection of natural variability in phytoplankton: Unattended high-frequency measurements on board ferries in the Baltic Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 697–704. <https://doi.org/10.1006/jmsc.1998.0384>
- Rassoulzadegan, F., Laval-Peuto, M., Sheldon, R.W., 1988. Partitioning of the food ration of marine ciliates between pico- and nanoplankton. *Hydrobiologia* 159, 75–88. <https://doi.org/10.1007/BF00007369>
- Reid, P.C., Lancelot, C., Gieskes, W.W.C., Hagmeier, E., Weichart, G., 1990. Phytoplankton of the North Sea and its dynamics: A review. *Netherlands J. Sea Res.* 26, 295–331. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(90\)90094-W](https://doi.org/10.1016/0077-7579(90)90094-W)
- Reissmann, J.H., Burchard, H., Feistel, R., Hagen, E., Lass, H.U., Mohrholz, V., Nausch, G., Umlauf, L., Wicczorek, G., 2009. State-of-the-art review on Baltic mixing and consequences for eutrophication. *Prog. Oceanogr.* 82, 47–80.
- Reynolds, C.S., 2006. *Ecology of Phytoplankton*, Cambridge. ed. Cambridge.
- Reynolds, C.S., 1997. *Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory*. Ecology Institute Oldendorf.
- Reynolds, C.S., 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton



- selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 289, 9–21.
- Reynolds, C.S., 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24, 417–428. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.5.417>
- Riazoshams, H., Midi, H., Ghilagaber, G., 2019. Outlier Detection in Nonlinear Regression, in: Riazoshams, H., Midi, H., Ghilagaber, G. (Eds.), *Robust Nonlinear Regression*, Wiley Online Books. pp. 107–141. <https://doi.org/doi:10.1002/9781119010463.ch6>
- Ribalet, F., Marchetti, A., Hubbard, K.A., Brown, K., Durkin, C.A., Morales, R., Robert, M., Swalwell, J.E., Tortell, P.D., Armbrust, V.E., 2010. Unveiling a phytoplankton hotspot at a narrow boundary between coastal and offshore waters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16571–16576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005638107>
- Richardson, T.L., Pinckney, J.L., 2004. Monitoring of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* using gyroxanthin-based detection methods. *J. Appl. Phycol.* 16, 315–328. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047788.31312.4f>
- Riebesell, J.F., 1974. Paradox of Enrichment in Competitive Systems. *Ecology* 55, 183–187.
- Riegman, R., Colijn, F., Malschaert, J.F.P., Kloosterhuis, H.T., Cadée, G.C., 1990. Assessment of growth rate limiting nutrients in the north sea by the use of nutrient-uptake kinetics. *Netherlands J. Sea Res.* 26, 53–60. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(90\)90055-L](https://doi.org/10.1016/0077-7579(90)90055-L)
- Riegman, R., Noordeloos, A.A.M., Cadée, G.C., 1992. Phaeocystis blooms and eutrophication of the continental coastal zones of the North Sea. *Mar. Biol.* 112, 479–484.
- Riegman, R., Van Boekel, W., 1996. The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: A review. *J. Sea Res.* 35, 235–242. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(96\)90750-9](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(96)90750-9)
- Rocha, M.P., Bini, L.M., Siqueira, T., Hjort, J., Grönroos, M., Lindholm, M., Karjalainen, S.M., Heino, J., 2018. Predicting occupancy and abundance by niche position, niche breadth and body size in stream organisms. *Oecologia* 186, 205–216. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3988-z>
- Rombouts, I., Simon, N., Aubert, A., Cariou, T., Feunteun, E., Guérin, L., Hoebeke, M., McQuatters-Gollop, A., Rigaut-Jalabert, F., Artigas, L.F., 2019. Changes in marine phytoplankton diversity: Assessment under the Marine Strategy Framework Directive. *Ecol. Indic.* 102, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.02.009>
- Rosati, I., Bergami, C., Stanca, E., Roselli, L., Tagliolato, P., Oggioni, A., Fiore, N., Pugnetti, A., Zingone, A., Boggero, A., Basset, A., 2017. A thesaurus for phytoplankton trait-based approaches: Development and applicability. *Ecol. Inform.* 42, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2017.10.014>
- Rose, J.M., Caron, D.A., Sieracki, M.E., Poulton, N., 2004. Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* 34, 263–277. <https://doi.org/10.3354/ame034263>

- Roselli, L., Litchman, E., Stanca, E., Cozzoli, F., Basset, A., 2017. Individual trait variation in phytoplankton communities across multiple spatial scales. *J. Plankton Res.* 39, 577–588. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbx001>
- Rousseau, V., Chrétiennot-Dinet, M.J., Jacobsen, A., Verity, P., Whipple, S., 2007. The life cycle of *Phaeocystis*: State of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry* 83, 29–47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6214-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6214-8_4)
- Roy, S., Chattopadhyay, J., 2007. Towards a resolution of “the paradox of the plankton”: A brief overview of the proposed mechanisms. *Ecol. Complex.* 4, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2007.02.016>
- Ruddick, K., Lacroix, G., 2006. Hydrodynamics and meteorology of the Belgian Coastal Zone, in: Rousseau, V., Lancelot, C., Cox, D. (Eds.), *Current Status of Eutrophication in the Belgian Coastal Zone*. pp. 1–15.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? *Cytom. Part A* 64, 16–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20106>
- Salmaso, N., Naselli-Flores, L., Padisák, J., 2015. Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshw. Biol.* 60, 603–619. <https://doi.org/10.1111/fwb.12520>
- Salomon, J., Breton, M., 1993. An atlas of long-term currents in the Channel. *Oceanol. acta* 16, 439–448.
- Savchuk, O.P., 2018. Large-scale nutrient dynamics in the Baltic Sea, 1970–2016. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00095>
- Sazhin, A.F., Artigas, L.F., Nejstgaard, J.C., Frischer, M.E., 2007. The colonization of two *Phaeocystis* species (Prymnesiophyceae) by pennate diatoms and other protists: A significant contribution to colony biomass. *Biogeochemistry* 83, 137–145. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6214-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6214-8_11)
- Schapira, M., Vincent, D., Gentilhomme, V., Seuront, L., 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 88, 649–662. <https://doi.org/10.1017/S0025315408001306>
- Schlüter, L., Møhlenberg, F., Havskum, H., Larsen, S., 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: Testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192, 49–63. <https://doi.org/10.3354/meps192049>
- Schmitt, F.G., Seuront, L., 2008. Intermittent turbulence and copepod dynamics: Increase in encounter rates through preferential concentration. *J. Mar. Syst.* 70, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.01.008>
- Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V., Lancelot, C., 2005. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: A review. *J. Sea Res.* 53, 43–66. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2004.01.008>

- Schoener, T.W., 1970. Nonsynchronous Spatial Overlap of Lizards in Patchy Habitats. *Ecology* 51, 408–418.
- Schofield, O., Grzymiski, J., Bissett, W.P., Kirkpatrick, G.J., Millie, D.F., Moline, M., Roesler, C.S., 1999. Optical monitoring and forecasting systems for harmful algal blooms: Possibility or pipe dream? *J. Phycol.* 35, 1477–1496. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3561477.x>
- Schubert, A., Telcs, A., 2014. A note on the Jaccardized Czekanowski similarity index. *Scientometrics* 98, 1397–1399. <https://doi.org/10.1007/s11192-013-1044-2>
- Seppälä, J., Ylöstalo, P., Kaitala, S., Hällfors, S., Raateoja, M., Maunula, P., 2007. Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73, 489–500. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.02.015>
- Seppälä, J., Ylöstalo, P., Kuosa, H., 2005. Spectral absorption and fluorescence characteristics of phytoplankton in different size fractions across a salinity gradient in the Baltic Sea. *Int. J. Remote Sens.* 26, 387–414. <https://doi.org/10.1080/01431160410001723682>
- Seuront, L., Schmitt, F., Lagadeuc, Y., Schertzer, D., Lovejoy, S., 1999. Universal multifractal analysis as a tool to characterize multiscale intermittent patterns: example of phytoplankton distribution in turbulent coastal waters. *J. Plankton Res.* 21, 877–822. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.5.877>
- Seuront, L., Vincent, D., Mitchell, J.G., 2006. Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *J. Mar. Syst.* 61, 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.04.010>
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2007. Heterotrophic dinoflagellates: A significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 352, 187–197. <https://doi.org/10.3354/meps07161>
- Shimada, A., Hasegawa, T., Umeda, I., Kadoya, N., Maruyama, T., 1993. Spatial mesoscale patterns of West Pacific picophytoplankton as analyzed by flow cytometry: their contribution to subsurface chlorophyll maxima. *Mar. Biol.* 115, 209–215.
- Sieburth, J., Smetace, K., Lenz, J., 1978. Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256–1263.
- Simpson, J.H., Nunes, R.A., 1981. The tidal intrusion front: An estuarine convergence zone. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 13. [https://doi.org/10.1016/S0302-3524\(81\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S0302-3524(81)80024-2)
- Simpson, J.H., Sharples, J., 2012. Introduction to the physical and biological oceanography of shelf seas.
- Skyllas, N., Bintanja, R., Buma, A.G.J., Brussaard, C.P.D., Gröger, M., Hieronymus, J., van de Poll, W.H., 2019. Validation of stratification-driven phytoplankton biomass and nutrient concentrations in the northeast atlantic ocean as simulated by EC-earth. *Geosciences* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/geosciences9100450>

- Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2001. Community Assembly in Marine Phytoplankton: Application of Recent Models to Harmful Dinoflagellate Blooms. *J. Plankton Res.* 23, 447–461. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.5.447>
- Smyth, T.J., Fishwick, J.R., Al-Moosawi, L., Cummings, D.G., Harris, C., Kitidis, V., Rees, A., Martinez-Vicente, V., Woodward, E.M.S., 2010. A broad spatio-temporal view of the Western English Channel observatory. *J. Plankton Res.* 32, 585–601. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp128>
- Sommer, U., Gliwicz, M.Z., Lampert, W., Duncan, A., 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. für Hydrobiologie* 106, 433–471.
- Sournia, A., Birrien, J.L., Douvillé, J.L., Klein, B., Viollier, M., 1987. A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. I. The spring bloom within the annual cycle. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 25, 355–367. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(87\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0272-7714(87)90078-3)
- Southward, A.J., Langmead, O., Hardman-Mountford, N.J., Aiken, J., Boalch, G.T., Dando, P.R., Genner, M.J., Joint, I., Kendall, M.A., Halliday, N.C., Harris, R.P., Leaper, R., Mieszkowska, N., Pingree, R.D., Richardson, A.J., Sims, D.W., Smith, T., Walne, A.W., Hawkins, S.J.B.T.-A. in M.B., 2005. Long-Term Oceanographic and Ecological Research in the Western English Channel, in: *Advances in Marine Biology*. Academic Press, pp. 1–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(04\)47001-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2881(04)47001-1)
- Stal, L.J., Albertano, P., Bergman, B., Von Bröckel, K., Gallon, J.R., Hayes, P.K., Sivonen, K., Walsby, A.E., 2003. BASIC: Baltic Sea cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea - Responses to a changing environment. *Cont. Shelf Res.* 23, 1695–1714. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2003.06.001>
- Stal, L.J., Staal, M., Villbrandt, M., 1999. Nutrient control of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 18, 165–173. <https://doi.org/10.3354/ame018165>
- Steele, J.H., Carpenter, S.R., Cohen, J.E., Dayton, P.K., Ricklefs, R.E., Levin, S.A., Powell, T.M., Steele, J.W., 1993. Comparing terrestrial and marine ecological systems, in: Levin, S.A., Powell, T.M., Steele, J.W. (Eds.), *Patch Dynamics*. Springer-Verlag, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-50155-5>
- Stelfox-Widdicombe, C.E., Archer, S.D., Burkill, P.H., Stefels, J., 2004. Microzooplankton grazing in Phaeocystis and diatom-dominated waters in the southern North Sea in spring. *J. Sea Res.* 51, 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2003.04.004>
- Stoń, J., Kosakowska, A., Łotocka, M., Łysiak-Pastuszak, E., 2002. Pigment composition in relation to phytoplankton community structure and nutrient content in the Baltic Sea. *Oceanologia* 44, 419–437. <https://doi.org/10.4135/9781849200387.n32>
- Sullivan, J.M., Donaghay, P.L., Rines, J.E.B., 2010. Coastal thin layer dynamics: Consequences to biology and optics. *Cont. Shelf Res.* 30, 50–65. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2009.07.009>
- Sultan, S.E., Spencer, H.G., 2002. Metapopulation Structure Favors Plasticity over Local Adaptation. *Am. Nat.* 160, 271–283.

- Swalwell, J.E., Ribalet, F., Armbrust, E.V., 2011. Seaflow: A novel underway flow-cytometer for continuous observations of phytoplankton in the ocean. *Limnol. Oceanogr. Methods* 9, 466–477. <https://doi.org/10.4319/lom.2011.9.466>
- Tan, L., Fan, C., Zhang, C., Zhao, X., 2019. Understanding and protecting forest biodiversity in relation to species and local contributions to beta diversity. *Eur. J. For. Res.* <https://doi.org/10.1007/s10342-019-01220-3>
- Tarran, G.A., Bruun, J.T., 2015. Nanoplankton and picoplankton in the Western English Channel: Abundance and seasonality from 2007–2013. *Prog. Oceanogr.* 137, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.04.024>
- Terseleer, N., Bruggeman, J., Lancelot, C., Gypens, N., 2014. Trait-based representation of diatom functional diversity in a plankton functional type model of the eutrophied southern North Sea. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1958–1972. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.6.1958>
- Thorel, M., Claquin, P., Schapira, M., Le Gendre, R., Riou, P., Goux, D., Le Roy, B., Raimbault, V., Deton-Cabanillas, A.F., Bazin, P., Kientz-Bouchart, V., Fauchot, J., 2017. Nutrient ratios influence variability in *Pseudo-nitzschia* species diversity and particulate domoic acid production in the Bay of Seine (France). *Harmful Algae* 68, 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.07.005>
- Thyssen, M., Alvain, S., Lefèbvre, A., Dessailly, D., Rijkeboer, M., Guiselin, N., Creach, V., 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, 4051–4066. <https://doi.org/10.5194/bg-12-4051-2015>
- Thyssen, M., Garcia, N., Denis, M., 2009. Sub meso scale phytoplankton distribution in the North East Atlantic surface waters determined with an automated flow cytometer. *Biogeosciences* 6, 569–583. <https://doi.org/10.5194/bg-6-569-2009>
- Thyssen, M., Grégori, G.J., Grisoni, J.M., Pedrotti, M.L., Mousseau, L., Artigas, L.F., Marro, S., Garcia, N., Passafiume, O., Denis, M.J., 2014a. Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: Influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Front. Microbiol.* 5, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00387>
- Thyssen, M., Grégori, G.J., Grisoni, J.M., Pedrotti, M.L., Mousseau, L., Artigas, L.F., Marro, S., Garcia, N., Passafiume, O., Denis, M.J., 2014b. Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: Influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00387>
- Thyssen, M., Lefèbvre, D., Caniaux, G., Ras, J., Fernández, I.C., Denis, M., 2005. Spatial distribution of heterotrophic bacteria in the northeast Atlantic (POMME study area) during spring 2001. *J. Geophys. Res. C Ocean.* 110, 1–17. <https://doi.org/10.1029/2004JC002670>
- Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., Denis, M., 2008a. Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *J. Plankton Res.* 30, 1027–1040. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn054>
- Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M. V., Holland, R.J., Grégori, G., Burkill, P.H., Denis, M.,

- 2008b. The emergence of automated high-frequency flow cytometry: Revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *J. Plankton Res.* 30, 333–343. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn005>
- Tilman, D., Kilham, S.S., Kilham, P., 1982. Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 349–372.
- Tonkin, J.D., Heino, J., Sundermann, A., Haase, P., Jähnig, S.C., 2016. Context dependency in biodiversity patterns of central German stream metacommunities. *Freshw. Biol.* 61, 607–620. <https://doi.org/10.1111/fwb.12728>
- Toth, G.B., Norén, F., Selander, E., Pavia, H., 2004. Marine dinoflagellates show induced life-history shifts to escape parasite infection in response to water-borne signals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, 733–738. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2654>
- Travers-Trolet, M., Verin, Y., 2014. CAMANOC cruise, RV Thalassa. <https://doi.org/10.17600/14001900>
- Tyrrell, T., Schneider, B., Charalampopoulou, A., Riebesell, U., 2008. Coccolithophores and calcite saturation state in the Baltic and Black Seas. *Biogeosciences Discuss.* 5, 485–494. <https://doi.org/10.5194/bgd-4-3581-2007>
- Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., Stramski, D., 2010. Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochem. Cycles* 24, 1–19. <https://doi.org/10.1029/2009GB003680>
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen. Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol.* 9, 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- van Donk, E., Ianora, A., Vos, M., 2011. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: A review. *Hydrobiologia* 668, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0395-4>
- Van Leeuwen, S., Tett, P., Mills, D., van der Molen, J., 2015. Stratified and nonstratified areas in the North Sea: Long-term variability and biological and policy implications. *J. Geophys. Res. Ocean.* 120, 4670–4686. <https://doi.org/10.1002/2014JC010485>.Received
- Vanhoutte-Brunier, A., Fernand, L., Ménesguen, A., Lyons, S., Gohin, F., Cugier, P., 2008. Modelling the *Karenia mikimotoi* bloom that occurred in the western English Channel during summer 2003. *Ecol. Modell.* 210, 351–376. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2007.08.025>
- Vantrepotte, V., Brunet, C., Mériaux, X., Lécuyer, E., Vellucci, V., Santer, R., 2007. Bio-optical properties of coastal waters in the Eastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 72, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.10.016>
- Vaulot, D., Marie, D., Olson, R.J., Chisholm, S.W., 1995. Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the Equatorial Pacific Ocean. *Science* 268, 16–18.
- Vaulot, D., Xiuren, N., 1988. Abundance and cellular characteristics of marine *Synechococcus*

- spp. in the dilution zone of the Changjiang (Yangtze River, China). *Cont. Shelf Res.* 8, 1171–1186.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: Current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* 64, 121–134. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2121>
- Verberk, W.C.E.P., van der Velde, G., Esselink, H., 2010. Explaining abundance-occupancy relationships in specialists and generalists: A case study on aquatic macroinvertebrates in standing waters. *J. Anim. Ecol.* 79, 589–601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01660.x>
- Verberk, W.C.E.P., Van Noordwijk, C.G.E., Hildrew, A.G., 2013. Delivering on a promise: Integrating species traits to transform descriptive community ecology into a predictive science. *Freshw. Sci.* 32, 531–547. <https://doi.org/10.1899/12-092.1>
- Verity, P.G., Villareal, T.A., Smayda, T.J., 1988. Ecological investigations of blooms of colonial *Phaeocystis pouchetii*. I. Size, abundance and metabolic rate. *J. Plankton Res.* 10, 219–248.
- Via, S., Lande, R., 1985. Genotype-Environment Interaction and the Evolution of Phenotypic Plasticity. *Evolution* (N. Y.) 39, 505–522. <https://doi.org/10.2307/2408649>
- Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x>
- Vogt, M., Hashioka, T., Payne, M.R., Buitenhuis, E.T., Quéré, C. Le, Alvain, S., Aita, M.N., Bopp, L., Doney, S.C., Hirata, T., Lima, I., Sailley, S., Yamanaka, Y., 2013. The distribution, dominance patterns and ecological niches of plankton functional types in Dynamic Green Ocean Models and satellite estimates. *Biogeosciences* 10, 17193–17247. <https://doi.org/10.5194/bgd-10-17193-2013>
- Volterra, V., 1928. Variazioni e fluttuazioni del numero d'individui in specie animali conviventi. *Mem. della regia Accad. Naz. del lincei ser.* 62, 31–113.
- Von Dassow, P., Van Den Engh, G., Iglesias-Rodriguez, D., Gittins, J.R., 2012. Calcification state of coccolithophores can be assessed by light scatter depolarization measurements with flow cytometry. *J. Plankton Res.* 34, 1011–1027. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs061>
- Vrieling, E.G., Vriezekolk, G., Gieskes, W.W.C., Veenhuis, M., Harder, W., 1996. Immuno-flow cytometric identification and enumeration of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* Hulbert in artificially mixed algal populations. *J. Plankton Res.* 18, 1503–1512. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.8.1503>
- Vuillemin, R., Sanfilippo, L., Moschetta, P., Zudaire, L., Carbones, E., Maria, E., Tricoire, C., Oriol, L., Blain, S., Le Bris, N., Lebaron, P., 2009. Continuous nutrient automated monitoring on the Mediterranean Sea using in situ flow analyser, in: *Proceedings of the OCEANS 2009*. Biloxi, MS, pp. 1–8. <https://doi.org/10.23919/OCEANS.2009.5422405>
- Wacquet, G., Hebert, P.-A., Poisson-Caillault, E., Louchart, A., Artigas, L.F., n.d. RclusTool:

- an R-based Graphical User Interface to explore and classify data interactively. *J. Stat. Softw.*
- Wacquet, G., Hébert, P.-A., Poisson-Caillault, E., Talon, P., 2020. RclusTool [WWW Document]. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/RclusTool/RclusTool.pdf>
- Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., Stal, L.J., 1997. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.* 136, 407–417. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00754.x>
- Ward, J.H.J., 1963. Hierarchical grouping to optimize and objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Wasmund, N., 1997. Occurrence of cyanobacterial blooms in the baltic sea in relation to environmental conditions. *Int. Rev. der Gesamten Hydrobiol.* 82, 169–174. <https://doi.org/10.1002/iroh.19970820205>
- Wasmund, N., Uhlig, S., 2003. Phytoplankton trends in the Baltic Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 60, 177–186. <https://doi.org/10.1016/S1054>
- Weithoff, G., Beisner, B.E., 2019. Measures and Approaches in Trait-Based Phytoplankton Community Ecology – From Freshwater to Marine Ecosystems. *Front. Mar. Sci.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00040>
- Wesslander, K., Andersson, L., Axe, P., Johansson, J., Linders, J., Nexelius, N., Skjevik, A.-T., 2017. Swedish National Report on Eutrophication Status in the Kattegat and the Skagerrak -OSPAR ASSESSMENT 2016., Report Oceanography.
- Weston, K., Greenwood, N., Fernand, L., Pearce, D.J., Sivyer, D.B., 2008. Environmental controls on phytoplankton community composition in the Thames plume, U.K. *J. Sea Res.* 60, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.09.003>
- Whittaker, R.H., Levin, S.A., Root, R.B., 1973. Niche, habitat, and ecotope. *Am. Nat.* 107, 321–338.
- Widdicombe, C.E., Eloire, D., Harbour, D., Harris, R.P., Somerfield, P.J., 2010. Long-term phytoplankton community dynamics in the Western English Channel. *J. Plankton Res.* 32, 643–655. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp127>
- Wiens, J.A., 1989. Spatial Scaling in Ecology. *Funct. Ecol.* 3, 385–397.
- Willey, J.M., Waterbury, J.B., 1989. Chemotaxis toward Nitrogenous Compounds by Swimming Strains of Marine *Synechococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1888–1894. <https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1888-1894.1989>
- Winder, M., 2009. Photosynthetic picoplankton dynamics in Lake Tahoe: Temporal and spatial niche partitioning among prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Plankton Res.* 31, 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp074>
- Wood, A.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Phinney, D.A., Yentsch, C.M., Waterbury, J.B., 1985. Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy, and flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.* 30,



1303–1315. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.6.1303>

- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., 2005. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Unesco Pub.
- Wulff, F., Stigebrandt, A., Rahm, L., 1990. Nutrient dynamics of the Baltic Sea. *Ambio* 19, 126–133.
- Wyatt, T., 2014. Margalef's mandala and phytoplankton bloom strategies. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 101, 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.12.006>
- Xiao, L.J., Zhu, Y., Yang, Y., Lin, Q., Han, B.P., Padisák, J., 2018. Species-based classification reveals spatial processes of phytoplankton meta-communities better than functional group approaches: a case study from three freshwater lake regions in China. *Hydrobiologia* 811, 313–324. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3502-y>
- Xiao, W., Wang, L., Laws, E., Xie, Y., Chen, J., Liu, X., Chen, B., 2018. Realized niches explain spatial gradients in seasonal abundance of phytoplankton groups in the South China Sea. *Prog. Oceanogr.* 162, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.03.008>
- Yentsch, C.S., 1962. Measurement of visible light absorption particulate matter in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 7, 207–217.
- Yentsch, C.S., Yentsch, C.M., 1979. Fluorescence Spectral Signatures: the Characterization of Phytoplankton Populations By the Use of Excitation and Emission Spectra. *J. Mar. Res.* 37, 471–483.
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 465, 33–52. <https://doi.org/10.3354/meps09879>

# **Annexes**

# Annexe I

<b>F0200001</b>	Standard beads	A standard is a reference defined by a user, a laboratory, or any acknowledged authority. Properties of standard beads are accurately known by the manufacturers (i.e. size, material, fluorescence properties). These fluorescent microbeads (or microsphere) are used as an absolute reference for quantitative and qualitative comparisons. Standard beads are analyzed routinely in every flow cytometry analyses in order to have confidence in the instrument performance (alignment and fluidics) and as well as in the results.
<b>F0200002</b>	Prochlorococcus	Prochlorococcus cells are defined as the smallest cyanobacteria found in the marine environment. No staining is required to distinguish them by flow cytometry. Compared to any other group, their forward scatter and red fluorescence signatures are the smallest recorded up to now and require sensitive Photo Multiplier Tube (PMT) or high powered lasers. The cluster, when well defined (often deep water communities) is below or may overlap that of the Synechococcus group, and is often partially masked by the instrument background noise. In samples stained for heterotrophic prokaryote detection, Prochlorococcus can be distinguished using the sideward scatter vs red fluorescence cytogram. They do not emit orange fluorescence because they lack phycoerythrin.
<b>F0200003</b>	Synechococcus	Synechococcus are unicellular photosynthetic cyanobacteria with flow cytometry forward scatter and sideward scatter signatures larger than those of most of marine heterotrophic bacteria. No staining is required to distinguish them by flow cytometry. The Synechococcus cluster has higher forward scatter and red fluorescence signatures than Prochlorococcus and a distinct orange fluorescence signature from their phycoerythrin accessory pigment when excited by lasers whose wavelength is below 533 nanometres. Cyanobacteria may contain phycocyanin, excited by a red laser and emitting above the chlorophyll-a emission wavelength. The Synechococcus cluster is well resolved in red vs green and in red vs orange fluorescence cytograms. Due to their small size (0.8 to 1.2 microns as reported in the literature), Synechococcus cells exhibit low intensity of forward and sideward scatters and red fluorescence signals.

<b>F0200004</b>	Eukaryote picophytoplankton	The eukaryote picophytoplankton group is defined by cells with a size range between 2 and 3 microns. No staining is required to distinguish them by flow cytometry. The smallest known eukaryotic picophytoplankton is <i>Ostreococcus</i> . Eukaryotic picophytoplankton exhibit a well-defined flow cytometry signature, with forward scatter and red fluorescence signals larger than that of <i>Prochlorococcus</i> and <i>Synechococcus</i> , and smaller than that of nanophytoplankton cells, though some overlap may happen. The forward scatter signal of 2 micron beads is widely used as an optical standard to localize this group. It is important to keep in mind that cell cycle within this group may generate cells with size greater than 2 microns (2-4 um in theory). They do not have an orange fluorescence signal.
<b>F0200005</b>	Eukaryote nanophytoplankton	The eukaryote nanophytoplankton group is defined by cells with a size range between 2 and 20 microns. No staining is required to distinguish them by flow cytometry. They differ from eukaryotic picophytoplankton by their larger red fluorescence, sideward scatter and forward scatter signals. Eukaryote nanophytoplankton cells can be separated from the cryptophyte cells due to their lack of orange fluorescence.
<b>F0200006</b>	Cryptophytes	Cryptophytes have higher forward scatter and orange fluorescence intensities than <i>Synechococcus</i> and a higher orange to red fluorescence ratio compared to other eukaryotic phytoplankton. Cryptophytes form their own cluster separated from the eukaryote nanophytoplankton cluster due to the presence of phycoerythrin and phycocyanin fluorescence signals. No staining is required to detect and discriminate them by flow cytometry. Their forward scatter signal can reach values close to that of microphytoplankton. They contain high amounts of phycoerythrin and may contain phycocyanin that can be excited by a red laser. If cryptophyte cells contain both phycoerythrin and phycocyanin, then they will emit a higher red fluorescence signal than cells containing only chlorophyll-a (energy transfer to red fluorescence).
<b>F0200007</b>	Coccolithophores	Coccolithophores are nanoplanktonic cells that build calcium carbonate coccoliths. When the cells have coccolith shells, due to their CaCO <sub>3</sub> platelet covering, they are characterized by a high depolarization ratios (Horizontally polarized Forward Light Scatter over Vertically polarized Forward Light Scatter

		(HFLS/VFLS)) and a high sideward scatter. Their forward scatter and red fluorescence signals are similar to those of the eukaryote nanophytoplankton group. No staining is required to distinguish them by flow cytometry.
<b>F0200008</b>	Microphytoplankton	<p>The microphytoplankton group is defined by cells with a size range between 20 and 200 microns. No staining is required to distinguish microphytoplankton by flow cytometry. This group is discriminated thanks to its forward scatter and red fluorescence signals larger than those of the other groups. Due to the low volumes analyzed by flow cytometry, this group is not always accurately quantified when cells are not abundant. It is possible to distinguish this group from nanophytoplankton (2-20 microns in diameter) when the forward scatter signal is calibrated to detect the forward scatter channel corresponding to the 20 micron limit in size. On cytometers equipped with an image in flow device, pictures are also used to measure cell size.</p> <p>Chains or colonies may outpass flow cytometry analysis depending on instrument performance (tubing size, pulse shape analysis or not). If large cryptophytes or coccolithophores are observed, they will be considered in a separate group thanks to their distinguishable optical properties.</p>

## Annexe II

Abondance (95% centile), taille (moyenne  $\pm$  écart-type), fluorescence rouge (95% centile) et fluorescence orange (95% centile) pour chaque groupe phytoplanctonique au sein de chaque communauté.

		C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>Synechococcus</i> -like	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )	6338 - 14793	6504 – 20705	853 - 32094	7049 – 69654	10218 – 45113	11115 – 131600
	CV abundance (%)	22	36	48	68	37	57
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup> 9.9 - 33	11.4 – 34.5	6.1 – 46.5	15.2 – 84.8	15.7 – 68.0	10.9 – 204.8
	CV TFLR (%)	33	34	50	66	43	68
	Size (µm)	2.02 $\pm$ 0.05	2.23 $\pm$ 0.11	2.19 $\pm$ 0.16	2.27 $\pm$ 0.16	2.26 $\pm$ 0.34	2.83 $\pm$ 0.78
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup> 1.5 – 2.5	1.3 – 2.3	1.1 – 1.9	0.9 – 1.8	0.9 – 1.9	0.8 – 1.9
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup> 0.9 – 1.2	0.8 – 1.1	0.7 – 1.0	0.5 – 1.0	0.6 – 1.1	0.6 – 1.3
PicoLowFLR	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )	47 - 212	189 – 550	0 – 570	244 – 50299	540 – 3824	460 – 65701
	CV abundance (%)	48	30	107	75	60	85
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup> 0.1 – 0.6	0.2 – 1.2	0.1 – 1.0	11.0 – 215.5	1.0 – 7.3	1.1 – 339.2
	CV TFLR (%)	55	63	94	85	65	89
	Size (µm)	2.38 $\pm$ 0.12	2.81 $\pm$ 0.14	2.66 $\pm$ 0.19	2.20 $\pm$ 0.10	2.72 $\pm$ 0.33	2.54 $\pm$ 0.68
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup> 1.3 – 3.8	1.0 – 2.8	1.1 – 6.2	2.4 – 5.7	1.2 – 3.4	2.0 – 9.6
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>1</sup> 1.7 – 2.7	1.6 – 2.2	1.3 – 2.8	2.0 – 3.2	1.6 – 7.1	2.0 – 8.0
PicoHighFLR	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )	5037 - 10952	5429 - 14768	0 – 21937	60 – 13024	5762 – 45874	198 – 29875
	CV abundance (%)	18	26	48	36	47	132
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup> 22.0 – 60.7	29.1 – 87.4	18.4 – 124.2	42.6 – 146.3	23.9 – 209.8	3.5 – 181.0
	CV TFLR (%)	24	43	52	47	51	98

	Size ( $\mu\text{m}$ )		$2.05 \pm 0.04$	$2.20 \pm 0.10$	$2.25 \pm 0.14$	$2.33 \pm 0.13$	$2.66 \pm 0.73$	$2.74 \pm 0.69$
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup>	4.2 – 6.6	3.6 – 7.6	0 – 8.6	6.9 – 21.9	2.8 – 6.6	3.1 – 44.7
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup>	0.2 – 0.3	0.2 – 0.3	0.2 – 0.3	0.2 – 0.5	0.3 – 0.4	0.2 – 3.4
Cryptophytes-like	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )		99 - 274	140 – 574	47 – 513	42 – 1646	118 – 1529	30 – 2041
	CV abundance (%)		32	40	44	60	79	100
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup>	9.7 – 33.5	8.5 – 47.7	6.6 – 49.1	2.6 – 36.7	14.0 – 185.3	2.6 – 302.5
	CV TFLR (%)		37	37	48	62	85	135
	Size ( $\mu\text{m}$ )		$5.90 \pm 0.30$	$5.60 \pm 0.36$	$6.02 \pm 0.62$	$5.90 \pm 0.43$	$6.87 \pm 0.89$	$6.50 \pm 1.14$
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	6.7 – 11.7	5.9 – 11.5	4.3 – 12.3	4.1 – 13.5	7.9 – 18.2	4.5 – 38.5
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	1.0 – 3.5	1.0 – 4.6	0.8 – 2.2	0.4 – 7.3	1.1 – 6.1	0.4 – 7.3
Coccolithophores-like	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )		99 - 274	1 – 32	8 – 160	0 – 120	29 – 268	6 – 1230
	CV abundance (%)		26	61	72	97	64	123
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup>	3.9 – 23.5	0.2 – 5.6	0.3 – 6.5	0 – 14.1	1.3 – 41.6	1.2 – 99.4
	CV TFLR (%)		58	62	74	97	142	105
	Size ( $\mu\text{m}$ )		$6.44 \pm 2.14$	$6.94 \pm 0.80$	$7.72 \pm 0.87$	$8.26 \pm 5.22$	$7.08 \pm 1.51$	$7.22 \pm 2.16$
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	2.9 – 11.0	12.9 – 22.4	1.6 – 6.1	4.1 – 13.5	3.2 – 21.1	5.9 – 28.6
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup>	0.4 – 2.8	0.9 – 20.7	0.3 – 0.8	0.1 – 5.9	0.5 – 1.4	0.8 – 7.1
NanoLowFLR	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )		525 – 2348	378 – 3910	71 – 2118	24 – 4502	321 – 8144	679 – 13501
	CV abundance (%)		37	56	52	75	99	63
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup>	11.2 – 35.6	6.2 – 59.1	8.0 – 47.0	29.7 – 221.9	16.1 – 371.3	31.0 – 865.3
	CV TFLR (%)		31	45	33	67	113	81
	Size ( $\mu\text{m}$ )		$2.89 \pm 0.15$	$3.23 \pm 0.30$	$3.60 \pm 0.26$	$3.59 \pm 0.15$	$3.74 \pm 0.67$	$3.79 \pm 0.76$
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	1.2 – 3.2	1.1 – 5.8	0.5 – 5.9	3.1 – 9.3	2.7 – 6.4	1.2 – 13.2
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup>	0.3 – 0.4	0.3 – 0.5	0.3 – 1.5	0.4 – 0.8	0.5 – 2.0	0.3 – 2.1
NanoHighFLR	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )		202 – 839	121 – 813	12 – 265	2 – 980	89 – 2189	38 – 4127
	CV abundance (%)		35	32	108	129	84	97

	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup>	17.6 – 47.7	20.6 – 77.0	2.1 – 48.3	11.5 – 185.8	13.6 – 648.6	204.8 – 1087.0
	CV TFLR (%)		24	29	97	141	112	102
	Size (µm)		3.91 ± 0.44	4.74 ± 0.84	5.92 ± 0.78	6.27 ± 0.52	5.47 ± 1.05	6.36 ± 1.37
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	5.4 – 12.7	7.1 – 17.1	4.0 – 30.5	16.6 – 32.7	9.2 – 30.9	8.0 – 51.8
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	0.1 – 0.1	0.1 – 0.2	0.1 – 2.2	0.1 – 0.2	0.1 – 1.3	0.1 – 1.9
Microphyto- plankton	Abundance (cell.cm <sup>-3</sup> )		8 – 80	8 – 91	0 – 69	2 – 70	25 – 138	3 – 350
	CV abundance (%)		48	56	48	97	45	119
	Total Red fluorescence (u.a. cm <sup>-3</sup> )	10 <sup>5</sup>	5.9 – 45.9	5.5 – 54.5	3.2 – 41.0	1.4 – 51.7	17.9 – 124.4	2.5 – 213.0
	CV TFLR (%)		49	57	51	99	52	112
	Size (µm)		15.82 ± 3.71	19.20 ± 2.68	17.50 ± 2.03	23.12 ± 3.90	20.87 ± 4.77	19.47 ± 5.93
	Red fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>4</sup>	3.8 – 9.8	4.0 – 11.6	3.5 – 8.4	4.1 – 10.8	5.0 – 15.1	1.3 – 18.4
	Orange fluorescence (ua.cell <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	0.3 – 3.1	0.3 – 3.0	0.3 – 1.9	0.3 – 1.0	0.4 – 1.4	0.2 – 2.1

---



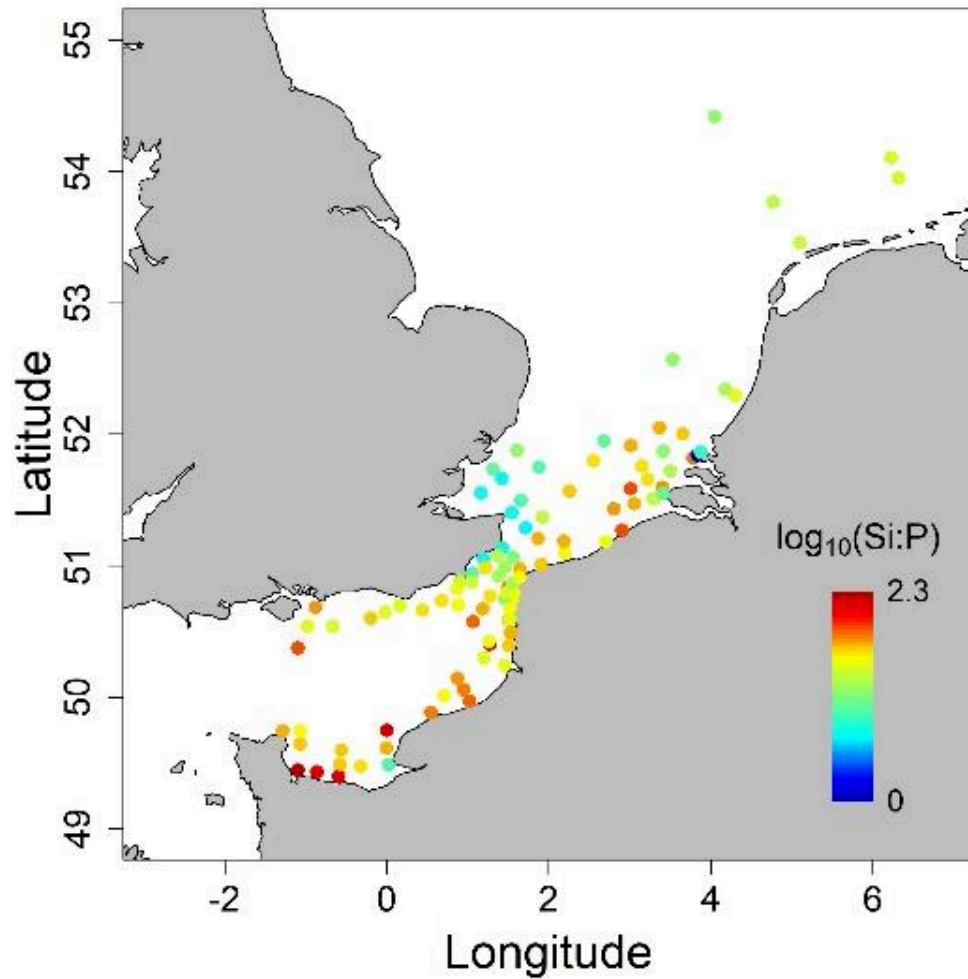
## Annexe III

Partitionnement de variance des groupes phytoplanctoniques (l'environnement inclus la température, la salinité et la turbidité).

	Environment		Space		Interaction		Residual
	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	
<i>Synechococcus</i> -like	0.01	0.01	0.34	0.01	0	0.01	0.65
PicoLowFLR	0.05	0.01	0.34	0.01	0.03	0.01	0.63
PicoHighFLR	0.04	0.01	0.36	0.01	0.02	0.01	0.62
Cryptophytes-like	0	0.01	0.36	0.01	0	0.01	0.64
Coccolithophores-like	0.03	0.01	0.24	0.01	0	n.s.	0.74
NanoLowFLR	0.01	0.01	0.36	0.01	0.01	0.01	0.64
NanoHighFLR	0	0.01	0.36	0.01	0	0.01	0.64
Microphytoplankton	0	0.01	0.36	0.01	0	0.01	0.64

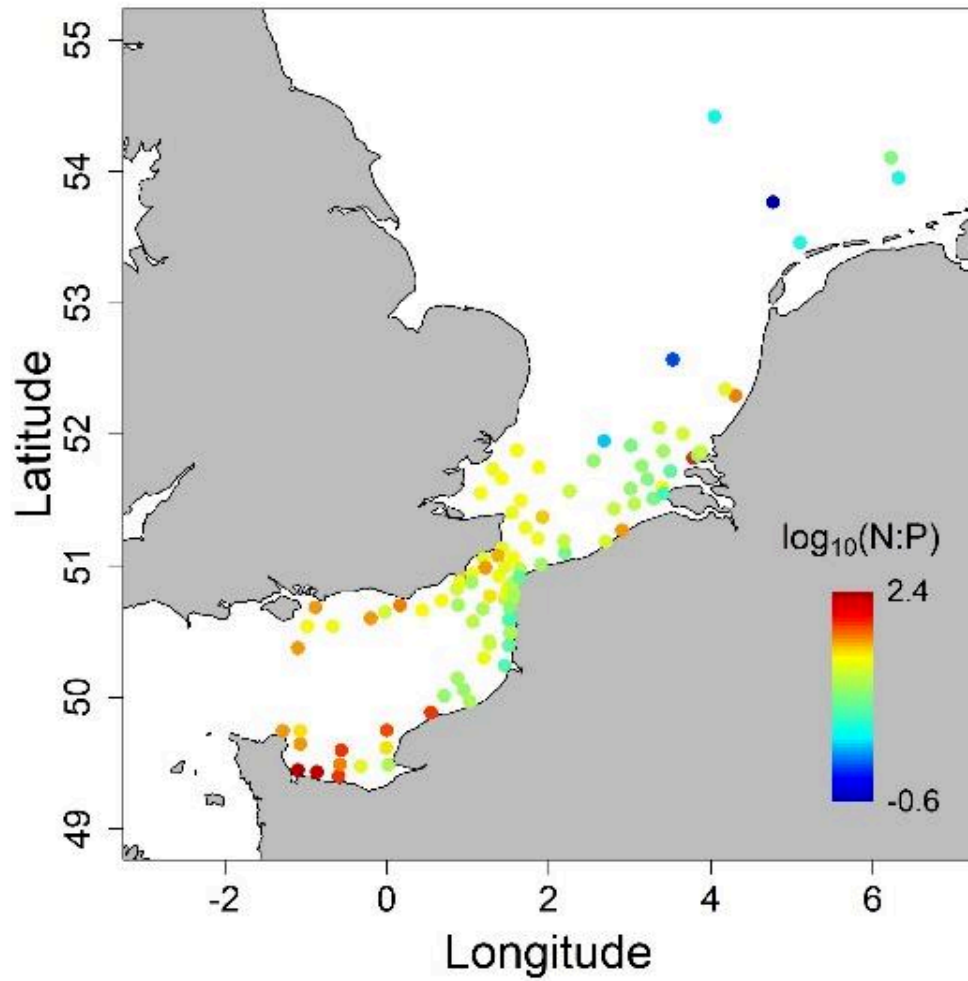
## Annexe IV

Variations spatiales du logarithme base 10 du ratio Si:P



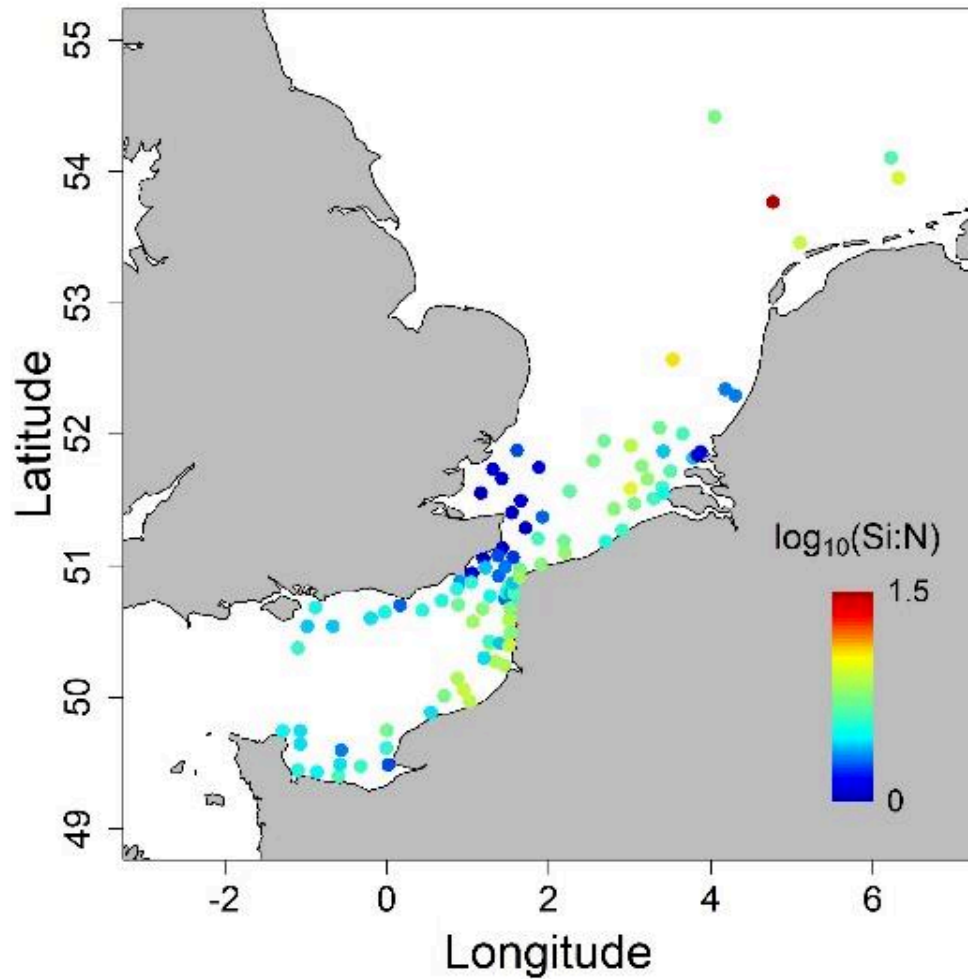
## Annexe V

Variations spatiales du logarithme base 10 du ratio N:P



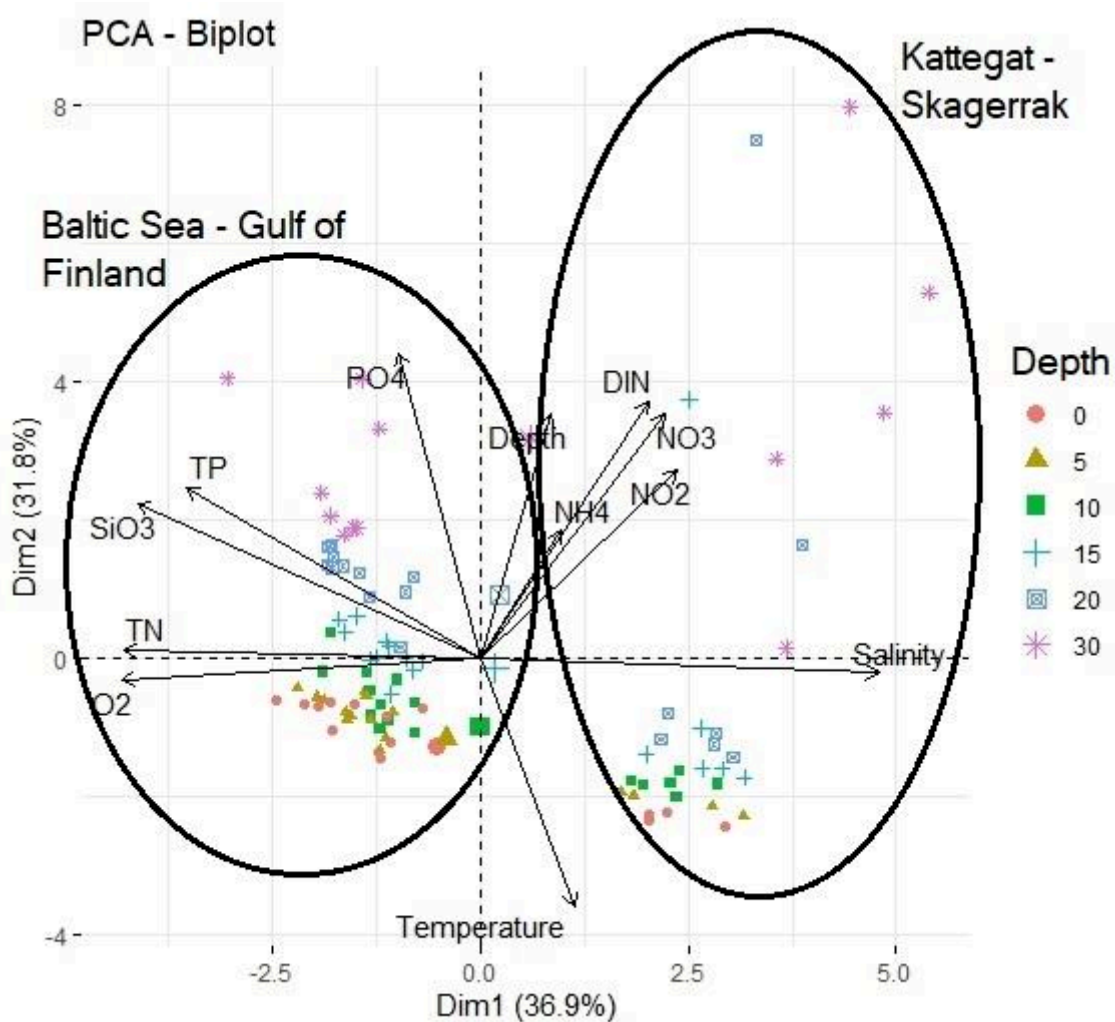
## Annexe VI

Variations spatiales du logarithme base 10 du ratio Si:N



## Annexe VII

ACP des données environnementales (température, salinité,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{SiO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , TN, TP, DIN,  $\text{O}_2$  et profondeur) pour sub-diviser le jeu de données original



## Annexe VIII

Subset	Depth	PCG	WitOMIG	Tolerance	Res. tolerance
Bal	surface	PicoORG	3.53	0.18	20%
		PicoLowFLR	3.45	0.22	19%
		PicoHighFLR	4.20	0.29	18%
		NanoLowORG	3.39	0.13	20%
		NanoHighORG	3.88	0.23	20%
		NanoLowFLR	3.51	0.18	19%
		NanoHighFLR	3.94	0.30	17%
		NanoSWS			
		MicroORG	3.56	0.18	19%
		MicroRED	4.13	0.25	17%
	5m	PicoORG	3.53	0.10	17%
		PicoLowFLR	3.48	0.11	16%
		PicoHighFLR	3.52	0.18	20%
		NanoLowORG	3.34	0.07	16%
		NanoHighORG	3.67	0.13	19%
		NanoLowFLR	3.40	0.10	18%
		NanoHighFLR	3.64	0.13	17%
		NanoSWS			
		MicroORG	3.48	0.71	17%
		MicroRED	3.64	0.70	16%
	10m	PicoORG	2.37	0.10	34%
		PicoLowFLR	2.37	0.17	40%
		PicoHighFLR	2.36	0.18	41%
		NanoLowORG	2.34	0.007	25%
		NanoHighORG	2.54	0.18	39%
		NanoLowFLR	2.41	0.15	40%
		NanoHighFLR	2.33	0.25	42%
		NanoSWS			
		MicroORG	2.41	0.08	34%
		MicroRED	2.48	0.23	40%
	15m	PicoORG	1.59	0.04	39%
		PicoLowFLR	1.72	0.07	34%
		PicoHighFLR	1.79	0.06	34%
		NanoLowORG	1.68	0.05	39%
		NanoHighORG	1.58	0.03	40%
		NanoLowFLR	1.72	0.08	37%
		NanoHighFLR	1.95	0.09	30%
		NanoSWS			
		MicroORG	1.65	0.05	39%
		MicroRED	1.66	0.06	35%
	20m	PicoORG	4.20	0.53	26%
		PicoLowFLR	4.64	0.66	20%
		PicoHighFLR	3.50	0.28	41%
		NanoLowORG	4.35	0.50	20%
		NanoHighORG	4.29	0.46	30%
		NanoLowFLR	4.40	0.46	25%

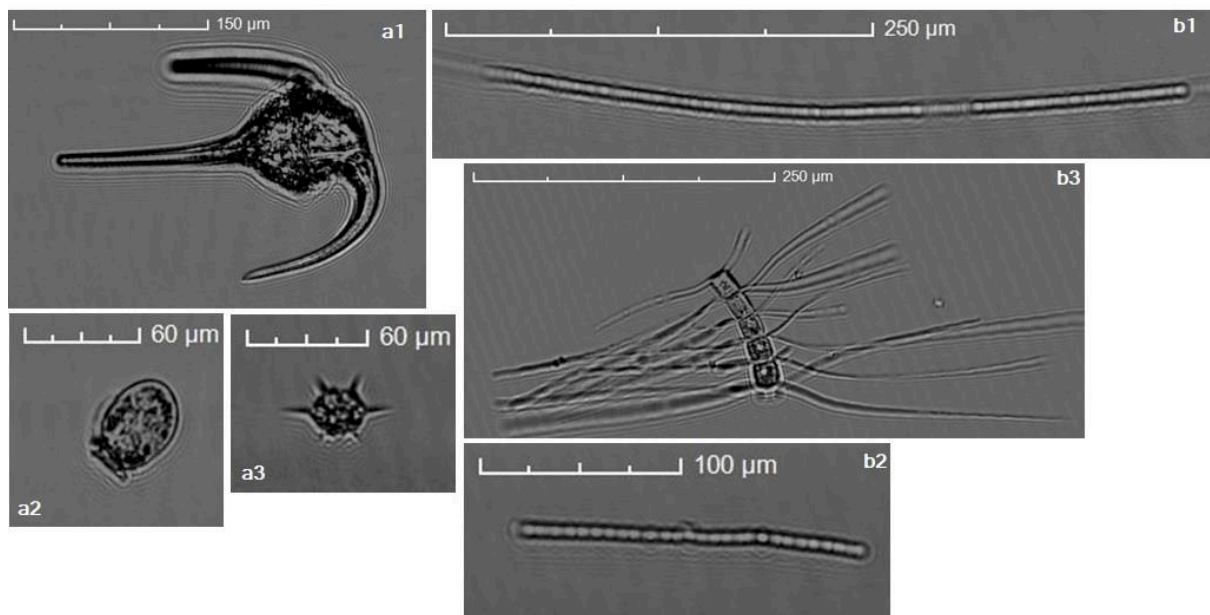
		NanoHighFLR	4.36	0.53	22%
		NanoSWS	4.97		
		MicroORG	4.42	0.56	22%
		MicroRED	4.77	0.59	21%
	30m	PicoORG	11.2	0.71	25%
		PicoLowFLR	11.75	0.77	28%
		PicoHighFLR	13.64	1.10	26%
		NanoLowORG	10.47	0.52	25%
		NanoHighORG	14.47	1.23	15%
		NanoLowFLR	11.49	0.62	27%
		NanoHighFLR	11.15	0.68	26%
		NanoSWS			
		MicroORG	11.75	0.84	25%
		MicroRED	10.68	0.49	29%
Kat	surface	PicoORG	5.92	1.53	12%
		PicoLowFLR	5.33	1.69	15%
		PicoHighFLR	7.29	1.35	8%
		NanoLowORG	6.25	1.50	11%
		NanoHighORG	5.56	1.97	15%
		NanoLowFLR	6.69	1.57	10%
		NanoHighFLR	5.05	1.81	17%
		NanoSWS	9.72	0.12	3%
		MicroORG	6.52	1.51	10%
		MicroRED	7.83	0.97	7%
	5m	PicoORG	5.52	1.51	21%
		PicoLowFLR	5.00	1.90	24%
		PicoHighFLR	7.51	1.15	12%
		NanoLowORG	5.74	1.50	18%
		NanoHighORG	2.98	0.83	50%
		NanoLowFLR	6.13	1.52	17%
		NanoHighFLR	7.29	1.50	13%
		NanoSWS	7.70	0.14	7%
		MicroORG	6.30	1.79	17%
		MicroRED	6.68	1.48	15%
	10m	PicoORG	8.58	0.05	4%
		PicoLowFLR	8.64	0.10	6%
		PicoHighFLR	8.77	0.09	6%
		NanoLowORG	8.76	0.08	5%
		NanoHighORG	8.42	0.10	6%
		NanoLowFLR	8.74	0.11	6%
		NanoHighFLR	8.99	0.10	6%
		NanoSWS	8.19	0.06	5%
		MicroORG	9.32	0.14	6%
		MicroRED	9.13	0.10	6%
	15m	PicoORG	7.60	0.20	47%
		PicoLowFLR	8.37	0.67	32%
		PicoHighFLR	9.33	0.67	21%
		NanoLowORG	8.00	0.38	44%
		NanoHighORG	7.37	0.13	54%
		NanoLowFLR	8.44	0.67	33%
		NanoHighFLR	9.31	0.73	28%
		NanoSWS	10.03	0.26	6%
		MicroORG	9.13	0.81	28%

		MicroRED	8.48	0.67	33%
	20m	PicoORG	8.69	0.71	61%
		PicoLowFLR	9.14	0.62	64%
		PicoHighFLR	8.97	0.34	60%
		NanoLowORG	13.09	6.82	46%
		NanoHighORG	14.13	10.02	40%
		NanoLowFLR	8.68	0.24	62%
		NanoHighFLR	9.40	0.20	56%
		NanoSWS	8.88	0.19	24%
		MicroORG	8.96	0.41	63%
		MicroRED	9.00	0.34	62%
	30m	PicoORG	33.79	5.10	32%
		PicoLowFLR	33.63	6.67	34%
		PicoHighFLR	34.94	4.93	29%
		NanoLowORG	37.68	4.96	22%
		NanoHighORG	37.61	7.79	27%
		NanoLowFLR	35.72	5.12	32%
		NanoHighFLR	28.08	4.06	33%
		NanoSWS	34.32	4.72	29%
		MicroORG	39.73	4.99	28%
		MicroRED	41.86	4.62	26%



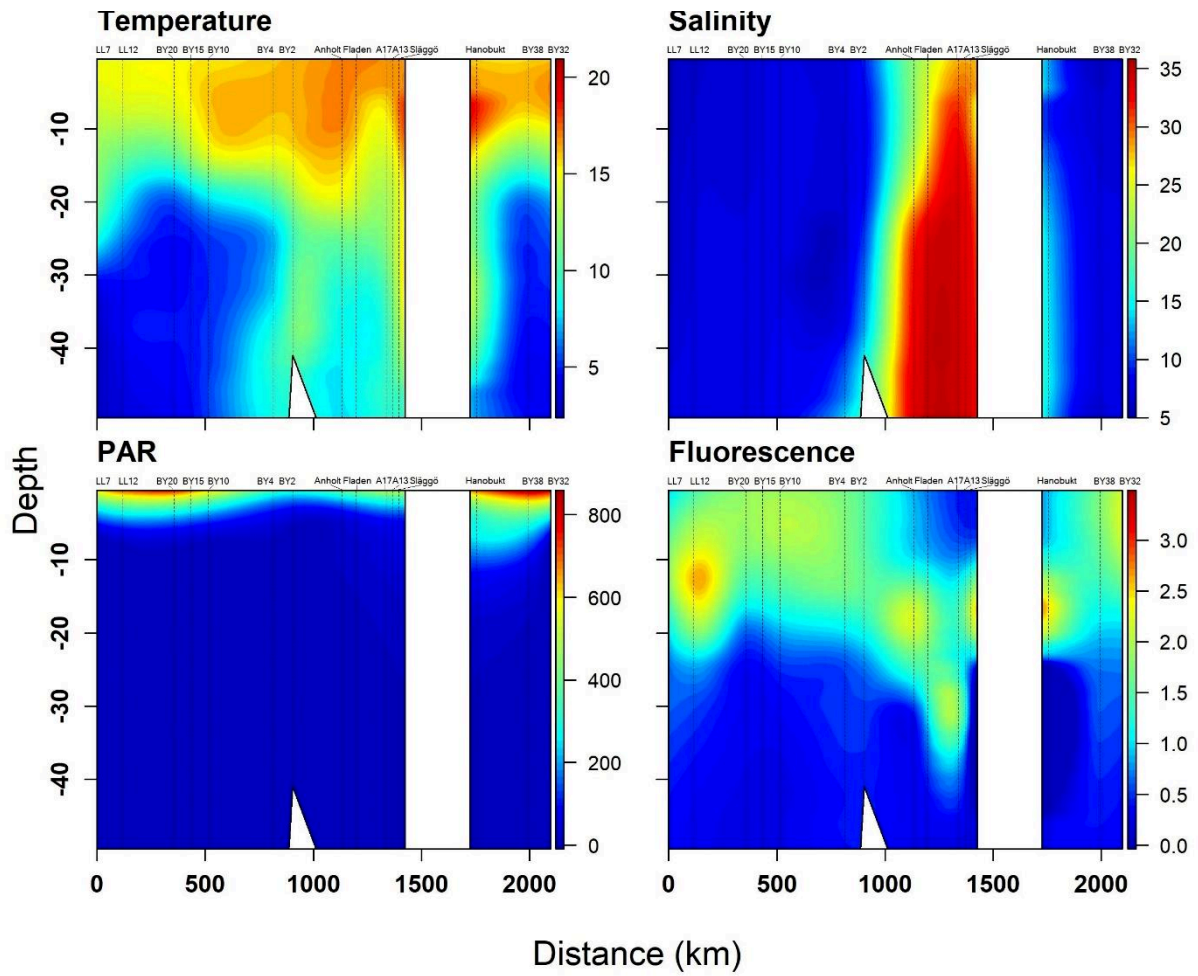
## Annexe IX

Exemple d'images prises par la caméra du CytoSense. A : images qui illustrent les taxons retrouvés dans le Kattagat et le Skagerrak (a1: *Tripos* spp., a2: *Dinophysis* spp. and a3: *Dichtyochoa* spp.). b: images qui illustrent les taxons retrouvés en Mer Baltique et dans le Golfe de Finlande (b1 and b2: cyanobactéries filamenteuses, *Nodularia* spp. ou *Dolichospermum* spp., b3: *Chaetoceros* spp.).



# Annexe X

Section verticale de la température, salinité, PAR et de la fluorescence *in vivo* acquises à partir de la CTD en Mer Baltique, Golfe de Finlande, Kattegat et Skaggearak



# Productions scientifiques

## Publication acceptée dans une revue internationale :

**A. Louchart**, F. Lizon, A. Lefebvre, M. Didry., F. G. Schmitt, L.F. Artigas. (2020). Phytoplankton distribution at sub-mesoscale across frontal systems during the summer-fall transition in the English Channel revealed by high-frequency automated flow cytometry. *Continental and Shelf Research*. 195. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2020.104056>

## Actes de conférence acceptés :

**A. Louchart**, R. De Blok, E. Debusschere, F. Gómez, A. Lefebvre, F. Lizon, J. Mortelmans, M. Rijkeboer, M., F.G. Schmitt, K. Deneudt, A. Veen, L.F. Artigas. (2020). Automated techniques to follow the spatial distribution of *Phaeocystis globosa* and diatoms spring blooms in the English Channel and North Sea. ICHA 2018 conference proceedings. *Harmful Algae 2018 – from ecosystems to socioecosystems. Proceedings of the 18<sup>th</sup> Intl. Conf.on Harmful Algae*. p51-54 ISBN: 978-87-990827-7-3

G. Wacquet, A. Lefebvre, C. Blondel, **A. Louchart**, P. Grosjean, N. Neaud-Masson, C. Belin, L.F. Artigas. (2020). Combination of machine learning methodologies and imaging-in-flow systems for the automated detection of Harmful Algae. *Harmful Algae 2018 – from ecosystems to socioecosystems. Proceedings of the 18<sup>th</sup> Intl. Conf.on Harmful Algae*. p46-50 ISBN: 978-87-990827-7-3

# Conférences internationales

Spatial distribution of phytoplankton communities in the English Channel, at sub-mesoscale, by applying innovative automated approaches. **Louchart A.**, Lizon F., Lefebvre A., Bouchaud F., Wacquet G., Dedécker C. Delarbre J., Wattiez H., Artigas L.F. *IMEKO TC19 Workshop on Metrology for the sea*, Naples, Italie, Octobre 2017.

Addressing high frequency phytoplankton dynamics from by automated flow cytometry and multi-spectral fluorometry in the Eastern Channel – Southern North Sea. **Louchart A.**, De Blok R., Debusschere E., Houliez E., Gómez F., Lefebvre A., Lizon F., Mortelmans J., Rijkeboer M., Deneudt K., Veen A., Schmitt F.G., Artigas L.F. *2019 IMBeR Open Science Conference*, Brest, France, Juin 2019.

Phytoplankton trait-based features sorted by an automated flow cytometry to study spatialized ecological niches **Louchart A.**, De Blok R., Debusschere E., Gómez F., Lefebvre A., Lizon F., Mortelmans J., Rijkeboer M., Deneudt K., Veen A., Schmitt F.G., Artigas L.F. *ICES Annual Science Conference 2019*, Göteborg, Suède, Septembre 2019.

## **Co-encadrement de stagiaires**

Claire Dedécker, Master 1 Sciences de la Mer, spécialité « Fonctionnement et Gestion des Ecosystèmes Marins ». *Caractérisation de la variabilité spatiale printanière des communautés phytoplanctoniques en Manche par application d'approches automatisée.*

Claire Dedécker, Master 2 Sciences de la Mer, spécialité « Fonctionnement et Gestion des Ecosystèmes Marins ». *Variabilité spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques en Manche, caractérisées par l'application de la cytométrie en flux.*



## Research papers

# Phytoplankton distribution from Western to Central English Channel, revealed by automated flow cytometry during the summer-fall transition

Arnaud Louchart<sup>a,\*</sup>, Fabrice Lizon<sup>a</sup>, Alain Lefebvre<sup>b</sup>, Morgane Didry<sup>a,c</sup>, François G. Schmitt<sup>a</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Littoral Côte D'Opale, Univ. Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire D'Océanologie et de Géosciences, F62930, Wimereux, France

<sup>b</sup> IFREMER, LER/BL, Boulogne sur Mer, France

<sup>c</sup> Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, UM110, 13288, Marseille, France



## ARTICLE INFO

## Keywords:

English Channel  
Phytoplankton distribution  
High resolution  
Automated flow cytometry  
Fronts  
Mesoscale structure

## ABSTRACT

Automated pulse shape-recording flow cytometry was applied to address phytoplankton spatial distribution, at high frequency, in stratified and well mixed water masses in the Western and Central English Channel during the summer-fall transition. Cytometric pulse shapes derived from optical features of single cells allowed the characterization of eight phytoplankton groups. Abundance and total red fluorescence (chlorophyll *a* auto-fluorescence) per group were used to define six phytoplankton communities. Their distribution revealed high spatial heterogeneity. Abundance presented a longitudinal gradient for six over the eight groups and succession of brutal shifts along the cruise. Maximum values were often located near the Ushant front in the Western English Channel. A latitudinal gradient characterised the Central English Channel waters under the influence of the Seine estuary. Picophytoplankton (*Synechococcus*-like cells and picoeukaryotes) represented up to 96% of total abundance and half of the total red fluorescence of the communities near the main front and the Bay of Seine, whereas nanoeukaryotes and microphytoplankton, represented only 4% and less than 1% respectively of total abundance. Both nanoeukaryotes and microphytoplankton dominated the total red fluorescence of the communities of the Central English Channel. The study of traits within each group showed a high variability of traits between communities. The comparison between traits showed that they were independent from each other for some groups (size and red fluorescence per cell for PicoHighFLR and Coccolithophore-like cells; orange and red fluorescence for all the groups), whereas they were dependent for other groups (red fluorescence per cell was dependent of size for picophytoplankton, NanoLowFLR, NanoHighFLR, Cryptophyte-like cells and Microphytoplankton). Variance partitioning revealed that the environmental parameters (temperature, salinity and turbidity) accounted less than spatial descriptors (physical and biological processes) in shaping the communities. Hydrological structures (frontal structures, eddies and tidal streams) were responsible for patches of phytoplankton and defined the structure at the sub-mesoscale (1–10 km) in this area.

## 1. Introduction

Carbon uptake and fixation through photosynthesis make phytoplankton account for up to 50% of the annual global net primary production, while its biomass only represents 2% of the total global biomass (Falkowski et al., 2003; Field et al., 1998). Furthermore, phytoplankton are involved in many biogeochemical cycles and in most of the marine food webs being a prey for grazers affecting growth, cellular processes and community composition (Holligan and Harbour, 1977; Lampert

et al., 1986; Rassoulzadegan et al., 1988). Given the importance of phytoplankton in marine ecosystems, there is a consequent need to perform accurate estimates of abundance and biomass (which are also defined as biological descriptors in the Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008/56/EC) and Water Framework Directive (2000/60/EC) in order to understand the populations assembly into different communities and how these communities influence/determine biogeochemical cycles as well as higher trophic levels (e.g. Falkowski et al., 1998; Litchman, 2007; Litchman et al., 2007). The large size-range

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [arnaud.louchart@gmail.fr](mailto:arnaud.louchart@gmail.fr) (A. Louchart), [felipe.artigas@univ-littoral.fr](mailto:felipe.artigas@univ-littoral.fr) (L.F. Artigas).

and diversity of phytoplankton characterise high variations of surface/volume ratios as well as physiological capacities, leading to a different capacity of growth among phytoplankton, sometimes dividing twice a day (Alpine and Cloern, 1988). In addition, environmental drivers are often episodic, contributing to quick changes of phytoplankton responses over space and time scales. Current monitoring sampling strategies might fail to detect these responses (Pearl et al., 2007). Therefore, a trade-off in phytoplankton sampling strategies is needed in order to understand the determinism of phytoplankton changes and distribution, considering both fine space and time scales and environmental parameters.

Considering the techniques available, the use of microscopy and HPLC pigment analysis provide, respectively, high taxonomical and pigmentary composition. However, they are not suitable for high space and time resolution studies (Cullen et al., 1997; Millie et al., 1997; Richardson and Pinckney, 2004) because of the time-consuming and highly specialised work to be carried out back at the laboratory. On the other hand, despite *in vivo* fluorometry could reach a reliable space and time coverage (Rantajärvi et al., 1998), it provides only bulk measurements as estimates of total chlorophyll *a* (as a proxy of phytoplankton biomass). Several innovative techniques (e.g. multispectral fluorometry, automated flow cytometry, remote sensing) have shown to give representative insights into phytoplankton composition (at least at the functional level), abundance and/or chlorophyll *a* at high resolution (Bonato et al., 2015; De Monte et al., 2013; Lefebvre and Poisson-Caillault, 2019; Marrec et al., 2018, 2014; Thyssen et al., 2015). Among these techniques, automated “pulse shape-recording” flow cytometry (PSFCM) addresses almost the whole phytoplankton size-range (c.a. from less than 1  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$  width) at single-cell or single-colony level and characterizes them based on their combined or integrated optical properties (i.e. light scattering, fluorescence; Dubelaar et al., 2004, 1999). Indeed, this technique records the entire pulse shape of a single particle (Rutten et al., 2005; Thyssen et al., 2008b, 2008a), from small cells as *Prochlorococcus*-like (Marrec et al., 2018) up to large cells and/or colonies of diatoms or *Phaeocystis globosa* (Bonato et al., 2016, 2015; Rutten et al., 2005). Moreover, the cytometric optical properties provide useful proxies of cell length, width, morphology, internal composition and physiology which can be assimilated to functional derived traits. Therefore, the variation of phytoplankton traits at high frequency remain to be investigated across the different spatial scales.

The Western and Central part of the English Channel are well-documented areas which benefit from sustained monitoring (e.g. Astan Buoy, Astan & Estacade SOMLIT stations, L4 and E1 stations; Eloire et al., 2010; Goberville et al., 2010; Not et al., 2004; Smyth et al., 2010; Sourmia et al., 1987). This epicontinental sea is strongly impacted by climate variability (Goberville et al., 2010) making seasonal and inter-annual variation in the hydrological and climatic conditions responsible of changes in plankton communities composition (Foulon et al., 2008; Marie et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010). In the Western English Channel (WEC), from May to October, the hydrological conditions go from well-stratified to well-mixed conditions and shape the position of the Ushant tidal front (Pingree and Griffiths, 1978). Eddies that bring high nutrient concentrations in addition to the light, make communities accumulating along the front, especially diatoms and dinoflagellates, and contribute to high biomass (Landeira et al., 2014; Pingree et al., 1979, 1978, 1977). Moreover, the geostrophic flow, eddies, wind upwelling and tidal streams occur along the front allowing phytoplankton dispersion and crossing the front (Pingree et al., 1979). Therefore, the front extends on scales from meters to kilometres (d’Ovidio et al., 2010; Ribalet et al., 2010). In the Central English Channel (CEC), both the English and the French coast are influenced by river run-off. In the French part, the Seine River contributes to form permanent halocline stratification (Brylinski and Lagadeuc, 1990; Menesguen and Hoch, 1997). During the late summer-fall period, the Bay of Seine is initially characterised by high abundance of diatom (Jouenne et al., 2007). Then, when the depletion of nutrient occurs in

summer, diatom abundance decrease and dinoflagellate abundance increase (Thorel et al., 2017). Along the English coast, the Southampton Water estuarine system contributes largely to enhance nutrients along the coast (Hydes and Wright, 1999). Nutrients are especially brought by the Test and Itchen rivers, which drain agricultural land as well as sewage discharge effluents (Hydes and Wright, 1999) resulting in chlorophyll *a* peaks in spring and summer (Iriarte and Purdie, 2004; Kifle and Purdie, 1993; Leakey et al., 1992).

Despite most of phytoplankton studies in the English Channel concerned the coastal areas (e.g. Hydes and Wright, 1999; Iriarte and Purdie, 2004; Jouenne et al., 2007; Marie et al., 2010; Not et al., 2004; Pannard et al., 2008; Smyth et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010), some of them concerned coastal-offshore gradients focusing both in the Eastern English Channel (EEC, Bonato et al., 2016, 2015; Lefebvre and Poisson-Caillault, 2019), Central English Channel (WEC, Napoléon et al., 2014, 2012) and Western English Channel (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013; Napoléon et al., 2013). Some attempts were carried out on transects crossing the English Channel in the WEC and CEC (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Marrec et al., 2014, 2013; Napoléon et al., 2013). However, these studies reflected three major drawbacks: first of all, some transects were carried out along a latitude gradient, missing the longitude component in which spatial gradients are particularly known to occur in the English Channel (Napoléon et al., 2014, 2013, 2012). Secondly, most of them resulted in a spatial aliasing by missing any fine spatial scale variability. Finally, these spatiotemporal studies mainly sampled the largest organisms (>20  $\mu\text{m}$ ) of the phytoplankton compartment, missing most of the picophytoplankton and the small nanophytoplankton (<20  $\mu\text{m}$ ) fraction.

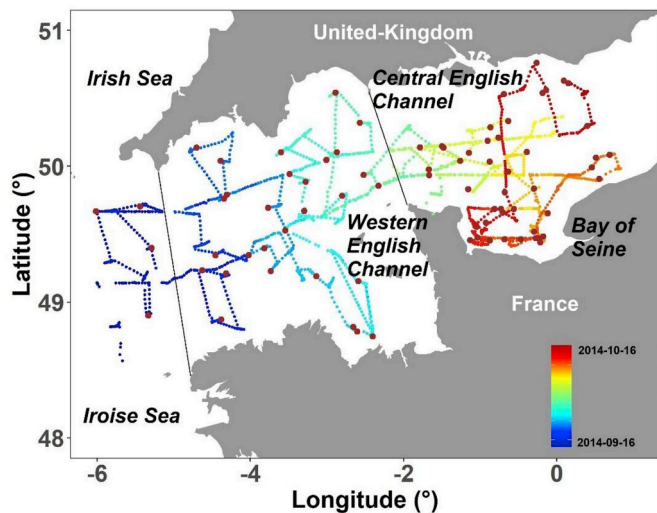
In the present study, we analyse the spatial distribution of some phytoplankton size- and optically-defined functional groups as well as their assembly in communities, highlighting the relation between environmental and spatial features with phytoplankton communities’ variability, addressed at high frequency, on a high spatial sampled gridded area. Phytoplankton single-cells and colonies were characterised by continuous recording of sub-surface pumped seawater, by using an automated “pulse shape-recording” flow cytometer coupled to continuous recording hydrological features. With a high resolution spatial sampling strategy, our aims were: (i) to study the phytoplankton distribution per functional group and the variation of the traits within each group across space with respect to meso- to sub-mesoscale hydrological features as frontal areas (ii) to identify the key environmental and spatial variables that could explain the variability between communities’ composition and (iii) to define the scale of variability of phytoplankton communities among sites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cruise outlines

Samples were collected during a multidisciplinary cruise focusing on an ecosystemic end-to-end approach of fisheries in the Western English Channel. The CAMANOC (CAmpagne MANche OCcidentale, Travers-Trolet and Verin, 2014) cruise took place on board the RV *Thalassa* (Ifremer) from the 16th of September to the 16<sup>th</sup> of October 2014, during the summer-fall transition. The ship crossed the English Channel from West to East (Fig. 1). A Pocket-FerryBox system (PFB, 4H-JENA) was coupled to a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM, CytoSense, CytoBuoy), a thermosalinometer (SeaBird SBE21) and an *in vivo* fluorometer (Turner Designs 10-AU). *In vivo* fluorometer required a two steps calibration. The first one used a blank water (de-ionized water) and the second one used a solid standard. The water intake was at the front of the ship’s cooling system at a fixed depth (4 m), and in normal ship operation seawater is constantly pumped. The PFB was assembled with sensors for salinity and temperature (Seabird 45 micro TSG), and turbidity (Seapoint). Seawater was pumped at 4 m depth and was





**Fig. 1.** Continuous recording every 10 min by a pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM) during the CAMANOC cruise from Sept. 16th (blue dots) to Oct. 16th (red dots) and 78 discrete (CTD) stations (brown dots). Dashed lines correspond to geographical separation of the main regions: Celtic Seas (including Irish and Iroise Sea), Western English Channel and Central English Channel. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

continuously analysed by all the sensors. The acquisition of data was continuously performed, and we obtained an integration of the measurement from 1 min (PFB) to 10 min (PSFCM). Because of a relatively brief transit time of water from the water intake to PFB, the observations are representative of sub-surface conditions. The lower resolution was kept to merge phytoplankton functional features with environmental data. The ship navigated at the speed of 11 knots for 1 month. This led to a resolution of approximately 3.4 km (for automated flow cytometry) with a total of 2910 samples, considering stops for discrete fisheries, benthos, plankton and hydrological sampling.

## 2.2. Stratification and mixing of water masses

CTD (Seabird SBE 21) casts (78) were performed during the cruise. Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinity, density ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and depth (m) were recorded at a rate of 1 measure per second. We used the density from the CTD casts to calculate the squared of buoyancy frequency,  $N^2$  ( $\text{s}^{-2}$ ; Eq. 1), in order to quantify the vertical density gradient throughout the water column which quantifies the stratification:

$$N^2 \equiv g/\rho_0 \times (\delta\rho(z) / \delta z) \quad (1)$$

where  $g$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ) is the acceleration due to gravity,  $\rho_0$  ( $1026 \text{ kg m}^{-3}$ ) is seawater reference density,  $\delta\rho$  ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) is the density differential along the water column and  $\delta z$  is the depth of the water column, between surface and bottom.

## 2.3. Plankton analysis

Continuous pumped waters as well as discrete samples were analysed by a CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherlands), an automated flow cytometer (FCM) with the ability of recording the entire optical pulse shape of each particle ("pulse shape-recording flow cytometer": PSFCM). Five signals compose a particle optical profile. The forward scatter (FWS) is collected via a PIN photodiode whereas the sideward scatter (SWS) and three types of fluorescence: red fluorescence (FLR: 668–734 nm), orange fluorescence (FLO: 604–668 nm) and yellow fluorescence (FLY: 536–601 nm) are collected via a photomultiplier. The instrument uses a solid-state laser (Coherent Inc, 488 nm, 50 mV) to

analyse, count and characterise single-cells and colonies (Dubelaar et al., 2004; Pomati et al., 2013; Pomati and Nizzetto, 2013) from 1  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$  width and a few mm length (Dubelaar et al., 1999). Each particle passes through a 5  $\mu\text{m}$  laser beam at a speed of 2  $\text{m s}^{-1}$ . A trigger-level was used on the red fluorescence (FLR) in order to separate phytoplankton and non-fluorescent particles (Thyssen et al., 2015). Continuous recording was performed with this configuration and the trigger-level was set at 15 mV during 9 min at a flow rate of 4.5  $\mu\text{L s}^{-1}$ . The clustering was performed manually with the CytoClus software (Cytobuoy b.v., [www.cytobuoy.com](http://www.cytobuoy.com)). The determination of each group was processed considering the amplitude and the shape of the five signals, referring also to previous work on automated flow cytometry in this area (Bonato et al., 2016, 2015; Thyssen et al., 2015) and according to bead size calibration. In addition, the CytoClus software provides several statistical features on each signal (e.g. Length, Total, Average ...) as well as the distribution of the different populations of events. The length of the FWS was used as a proxy for cell size. A standardisation of each particle from each cluster was carried out with calibrated beads of 3  $\mu\text{m}$ . Two thresholds were set up: the first around 3  $\mu\text{m}$  in order to separate picoeukaryotes from nanoeukaryotes and the second around 20  $\mu\text{m}$  in order to separate nanoeukaryotes from microphytoplankton. A group was named according to its estimated size and to its pigmentary features. Following Bonato et al. (2015) particle size was corrected with the measured length FWS of the beads (Eqs. 2 and 3).

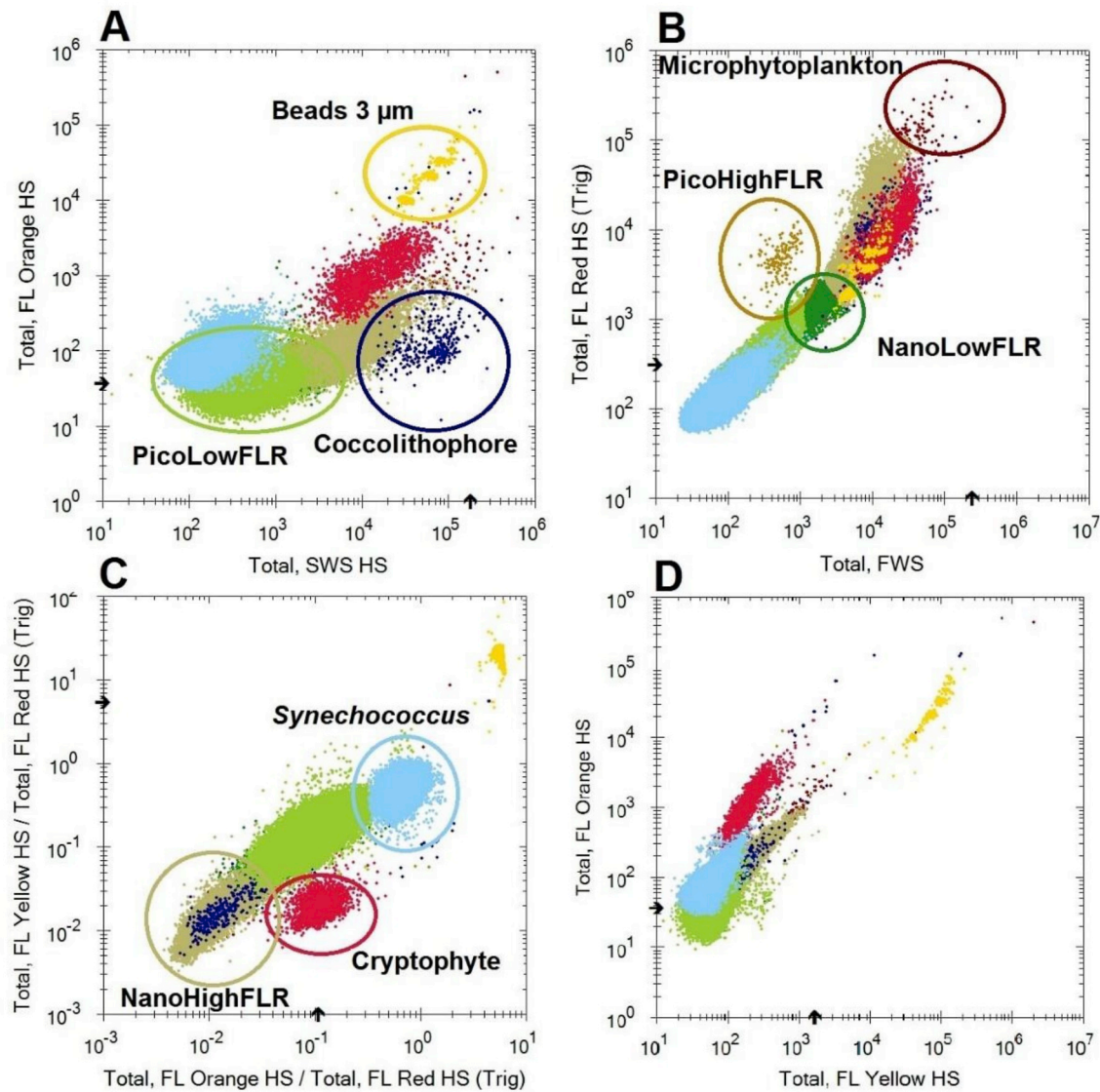
$$\text{Correction factor} = \text{real beads size} / \text{Measured beads size} \quad (2)$$

$$\text{Estimated particles size } (\mu\text{m}) = \text{Measure particles size} \times \text{Correction factor}(3)$$

Based on the common vocabulary for automated FCM (available at <https://www.seadatanet.org>), we characterised 6 main functional groups by automated flow cytometry: *Synechococcus*-like cells, picoeukaryotes, nanoeukaryotes, Cryptophyte-like cells, Coccolithophore-like cells and Microphytoplankton. In addition, sub-groups were characterised within the picoeukaryotes and nanoeukaryotes groups, according to their red fluorescence's level. Finally, we defined three picophytoplankton groups (<3  $\mu\text{m}$ ): *Synechococcus*-like cells, Pico-LowFLR, PicoHighFLR; four nanoeukaryotes groups (3–20  $\mu\text{m}$ ): Cryptophyte-like cells, Coccolithophore-like cells, NanoLowFLR and NanoHighFLR; and one microphytoplankton group (>20  $\mu\text{m}$ ; Fig. 2).

## 2.4. Statistical analysis and mapping

We considered the environmental parameters (*i.e.* temperature, salinity and turbidity) and *in vivo* total fluorescence obtained either by the thermo-salinometer (temperature and salinity), the PFB (turbidity) and the Turner fluorometer (*in vivo* total fluorescence) to compute a hierarchical classification analysis based on Euclidean distance. A hierarchical classification was computed also for cytometric groups, separately, to characterise the similarity between the phytoplankton communities among the sites. We used scaled data to detect the similarity among the relative changes in community composition, and we computed the Jaccardized Czekanowski similarity index (also known as quantitative Jaccard). In most recent studies on the spatial distribution of phytoplankton, the common procedure is a computation of Bray-Curtis dissimilarity matrix to define communities (Legendre and Legendre, 1998). However, Bray-Curtis generates a semi-metric matrix which is not as strong as the quantitative Jaccard which generates a metric matrix for cluster analysis. Thus, the Jaccardized Czekanowski index would be more suitable than Bray-Curtis for similarity studies (Schubert and Telcs, 2014). This distance was computed per phytoplankton feature (*i.e.* abundance, red fluorescence) calculated from the cytometric groups such as described in Bonato et al. (2015) in order to get the similarity between pairs of samples. We processed the computation of an average similarity matrix between a matrix based on abundance and a matrix based on red fluorescence. This method is more reliable than using them separately because abundance and red



**Fig. 2.** Cytograms allowing the characterization of different phytoplankton groups. (A) Total Orange Fluorescence (TFO) vs. Total Sideward Scatter (Total SWS). (B) Total Red Fluorescence (TFLR) vs. Total Forward Scatter (Total FWS). (C) Ratio of Total Yellow Fluorescence over Total Red Fluorescence and Total Orange Fluorescence over Total Red Fluorescence (TFLY/TFLR)/(TFLO/TFLR). (D) Total Orange Fluorescence (TFLO) vs. Total Yellow Fluorescence (TFLY). Clusters of single, doubles and triples of beads of 3  $\mu\text{m}$  are merged here. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

fluorescence (proxy of chlorophyll content which in turn is used as a proxy of biomass) are considered as the main features to discriminate the communities. Each function was weighted between 0 and 1. Abundance accounted for 0.5 as well as red fluorescence. We coupled the final similarity matrix with the Ward method (Ward, 1963) which consist in aggregating at each step the two clusters with the minimum within-cluster inertia and detect the homogeneity of the clusters. Then, the optimal classification cut level was obtained by selecting the maximum average silhouette over the Cophenetic distances. These analyses were processed using the packages “vegan”, “analogue” and “cluster” on R. The importance of environment and space (defined as the Euclidean distance between a pair of latitude and longitude coordinates) for structuring phytoplankton communities was studied among each community by processing a variation partitioning (Borcard et al., 1992; Peres-Neto et al., 2006). In our model, the total variance is represented by four fractions [a + b + c + d] where [a + b] represents the environmental fraction; [b + c] represents the space fraction; [b] is the interaction between environment and space and [d] the residual

variance. Space was redefined by the calculation of the principal coordinates of neighbour matrices (PCNM, Borcard and Legendre, 2002) to define them as spatial descriptors of the relationship among sampling units. We used the *pcnm* function from the “vegan” package design for R environment. Phytoplankton communities were detrended using the Hellinger transformation which is appropriate for compositional data by reducing the impact of rare events which are more susceptible to sampling error (Legendre and Gallagher, 2001). In addition, transformation of the data will give the same weight to rare or very abundant groups. Partitions were tested by ANOVA over 999 permutations. Finally, we carried out a multivariate Mantel correlogram to investigate the relationship between geographical distance extracted from the latitude-longitude coordinates and phytoplankton communities over the water bodies. This analysis allowed the detection of the minimal distance at which the correlations disappear.



### 3. Results

#### 3.1. Hydrobiology

Each continuous-recorded physical variable as well as *in vivo* total fluorescence ( $\mu\text{g}$  equivalent of chlorophyll *a* per L) showed a strong spatial structure. The highest salinity values were recorded in the Western English Channel (35.5; WEC) and decreased moderately towards the East (35). In the Central English Channel (CEC) salinity strongly decreased from 35 in offshore waters to 33 in the inner part of the Bay of Seine (BOS; Fig. 3A). Colder waters characterised the entrance of the WEC and were surrounded by warmer waters both in the Celtic Seas as well as in mid WEC waters (Fig. 3B). Sharp transitions were evidenced (of only a few kilometres) both at the West and East of the colder area.

The highest turbidity values were recorded in the CEC, both in offshore and coastal waters (Fig. 3C). A sharp increase in chlorophyll *in vivo* fluorescence was evidenced from the outer shelf to the WEC (values shifted from around  $0.1 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$  to  $5.7 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ). Then, fluorescence levels decreased rapidly eastward in WEC (from  $5.7 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$  to  $1\text{--}1.5 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ; Fig. 3D). Spearman ranks correlation were negative and significant with temperature ( $\rho = -0.45$ ,  $p < 0.001$ ) and turbidity ( $\rho = -0.29$ ,  $p < 0.001$ ) whereas Spearman rank correlation between fluorescence and salinity was positive and significant ( $\rho = 0.31$ ,  $p < 0.001$ ).

Applying hierarchical clustering on the similarity matrix revealed 5 water masses (WM) in the English Channel (Fig. 4A). Mapping these water masses revealed that Western and Central English Channel were structured in hydrological blocks. WM1 corresponded to the eastern part

of the Western English Channel and Celtic Seas out of the Channel (Iroise and Irish Seas), whereas WM3 was located in between, in the centre of the WEC. WM2 was located in offshore waters mainly in the CEC. WM4 was under the influence of the Bay of Seine and WM5 was considered as mainly corresponding to the English coastal and offshore waters of the CEC.

The lowest temperature was recorded in the WM3 revealing also the strongest gradient ( $\Delta T = 4.18 \text{ }^\circ\text{C}$ , Fig. 3B and Table 1) whereas this water mass exhibited high stable salinity thus the lowest salinity gradient ( $\Delta \text{SAL} = 0.37$ , Fig. 3A and Table 1) among the water masses. The opposite pattern was observed in the WM1, WM2, WM4 and WM5, the difference of temperature was comprised between  $0.70 \text{ }^\circ\text{C}$  (WM4) and  $1.87 \text{ }^\circ\text{C}$  (WM1) with higher values than in WM3 whereas the salinity difference was comprised between 1.22 (WM5) and 1.99 (WM2) with lower values than in the WM3. Turbidity was also lower in WM3 than in any other WM and showed a small difference ( $\Delta \text{TURB} = 0.8 \text{ NTU}$ ). The highest range of turbidity values were found in the WM4 and WM5 (respectively  $\Delta \text{TURB} = 8.05 \text{ NTU}$  and  $\Delta \text{TURB} = 12.39 \text{ NTU}$ ), both WM under the influence of the Solent (UK) and Seine (France) estuaries. In WM3, *in vivo* chlorophyll fluorescence (Chl Flu) was higher than in any other water mass and showed the highest variability ( $\Delta \text{Chl Flu} = 5.22 \mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ).

On the West of the main frontal structure (WEC, Fig. 4B), corresponding to WM3,  $N^2$  values were higher and displayed more heterogeneous waters than in the East side (CEC and BOS), where the values of  $N^2$  were lower and displayed homogeneous waters. In the WEC (WM3),  $N^2$  values reached up to  $10^{-3} \text{ s}^{-2}$  whereas in the CEC and the BOS (WM2, WM4 and WM5), the order of magnitude of  $N^2$  values was between  $10^{-4}$  and  $10^{-5} \text{ s}^{-2}$  (Fig. 4B). In the Celtic seas, the  $N^2$  was recorded between

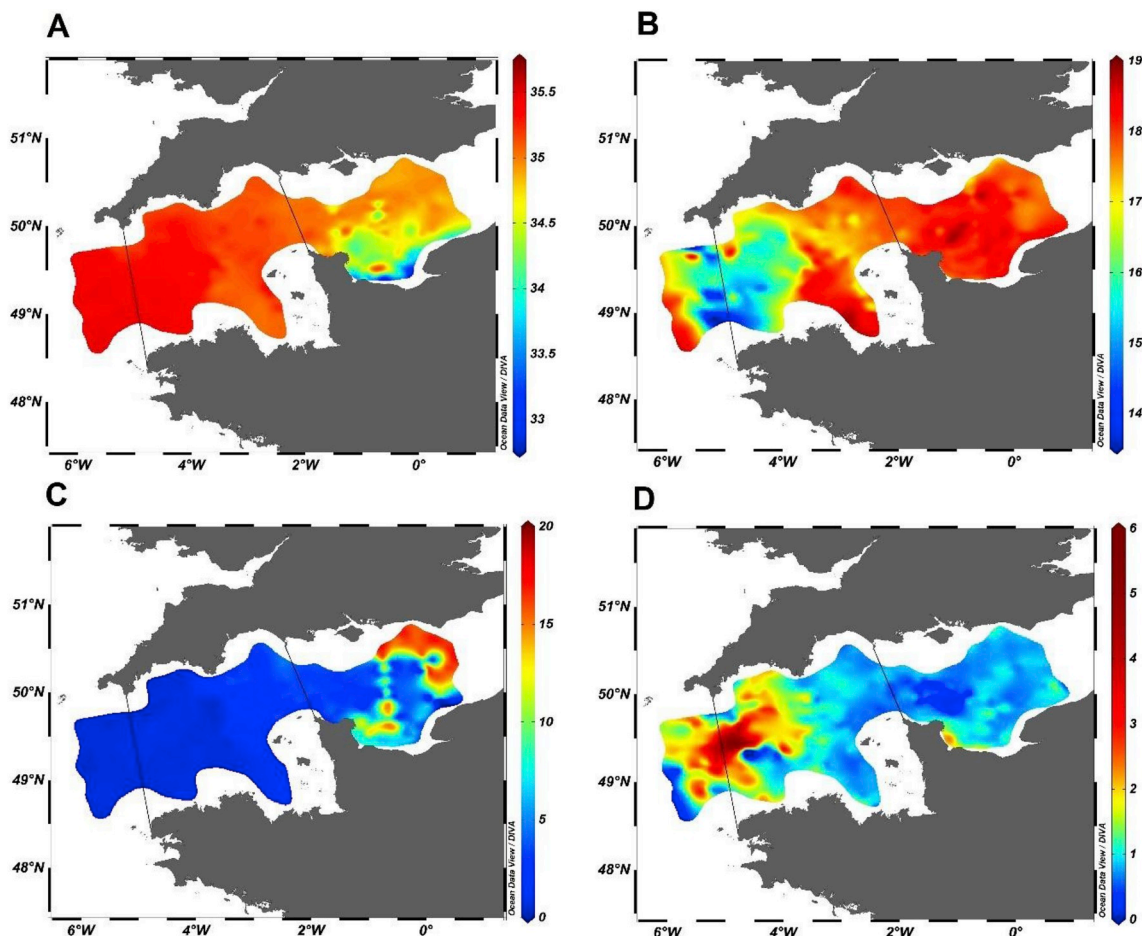
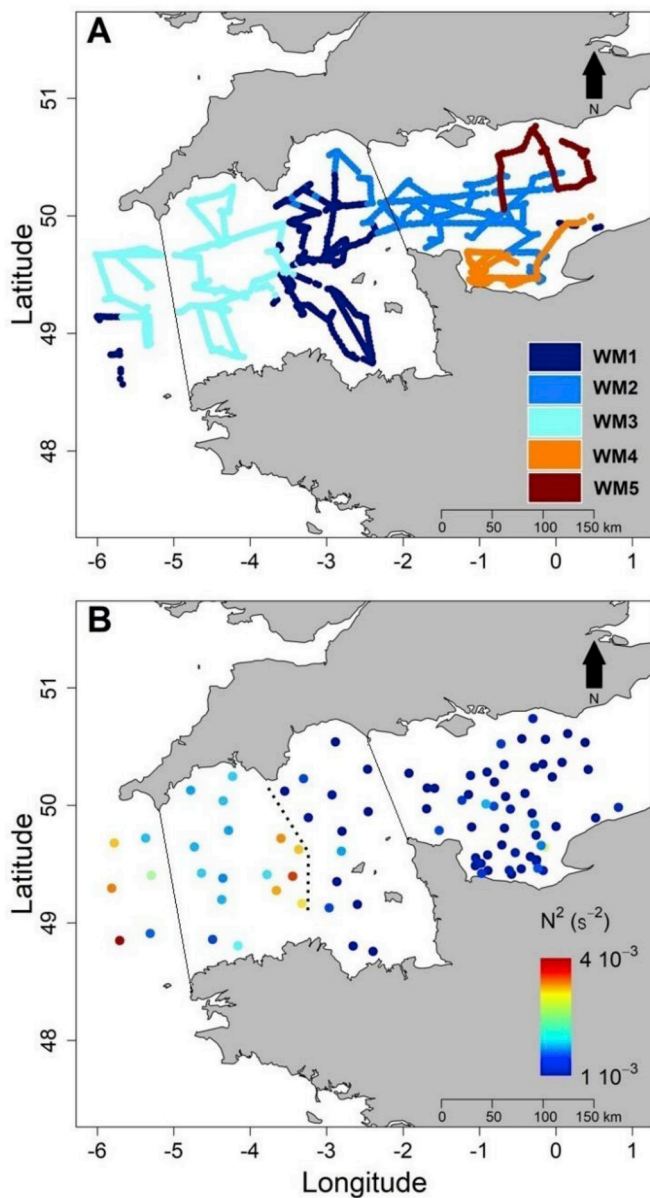


Fig. 3. Continuous recording of: A. Salinity B. Temperature ( $^\circ\text{C}$ ) C. Turbidity (NTU) D. Chlorophyll *in vivo* Fluorescence ( $\mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ ).



**Fig. 4.** A. Identification of water masses based on results from the Euclidean distance matrix on temperature, salinity, turbidity and *in vivo* chlorophyll fluorescence. B. Stratification, value of  $N^2$ , as derived from CTD casts. The dashed line distinguishes homogeneous water masses from heterogeneous water masses and marks the front.

$3.5$  and  $4.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  decreasing sharply eastward with the shift of temperature to reach  $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  in the WEC. They define the outer thermal front as well as the western limit between WM1 and WM3. Then a second change occurred between the WEC and the CEC. The values of the  $N^2$  in WM3 of up to  $4.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-2}$  shifted to  $10^{-4}/10^{-5} \text{ s}^{-2}$  the CEC (WM2, WM4) and the BOS (WM5) defining the inner thermal front.

### 3.2. Phytoplankton abundance, fluorescence and spatial distribution

Picoeukaryotes (PicoLowFLR and PicoHighFLR) and *Synechococcus*-like cells dominated the phytoplankton abundance. They were structured along a decreasing West-East longitudinal gradient but showing an important heterogeneity in spatial distribution (Fig. 5). High abundance was recorded in the Western English Channel (mostly in WM3) whereas low values were recorded in the Central English Channel and, for Picoeukaryotes, at the western entrance of the English Channel (Celtic

**Table 1**

Minimum and maximum values and coefficient of variation (CV) of temperature, salinity, turbidity and *in vivo* chlorophyll fluorescence (Chl Fluor) among the 5 water masses.

Water mass	Temperature (°C)	Salinity	Turbidity (NTU)	Chl Fluor ( $\mu\text{g chl Eq L}^{-1}$ )	
WM1	Min; max CV (%)	[16.97; 18.84] 35.49 2.5	[34.04; 35.49] 0.4	[0.01; 3.35] 50	[0.31; 1.67] 25
WM2	Min; max CV (%)	[17.55; 18.95] 35.16 1.5	[33.17; 35.53] 1.0	[2.62; 4.87] 15	[0.11; 1.47] 39
WM3	Min; max CV (%)	[13.94; 18.12] 35.53 5.5	[35.16; 35.53] 0.2	[0.51; 1.31] 19	[0.49; 5.71] 48
WM4	Min; max CV (%)	[17.61; 18.31] 34.82 0.7	[33.11; 34.82] 1.1	[6.23; 14.28] 27	[0.57; 2.31] 33
WM5	Min; max CV (%)	[16.91; 17.93] 35.00 1.2	[33.78; 35.00] 0.2	[6.34; 18.73] 4.5	[0.59; 1.16] 12

Seas, Figs. 5 and 6). However, the abundance of *Synechococcus*-like cells was high out of the Channel and in the WEC, and low in the CEC (Fig. 5A). PicoLowFLR abundance exhibited patches reaching more than  $1 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  in the WEC (5% of the highest abundance were representing  $950 \text{ km}^2$ ) and close to the Channel isles (Fig. 5B). PicoHighFLR (Fig. 5C) and Cryptophyte-like cells (Fig. 5D) showed the same patterns: low abundance out of the English Channel, sharp increase and high abundance in the WEC (both coastal and offshore waters, WM3), then a sharp decrease and low abundance in the eastern WEC and CEC. Coccolithophore-like cells (Fig. 5E) exhibited high abundance out of the Channel (western WM1), while the abundance remained low elsewhere. NanoLowFLR (Fig. 5F) showed several patches of high abundance (5% of the highest abundance represented  $1000 \text{ km}^2$ ) between the limits of WM3 (out of the Channel and in the WEC). In the CEC and BOS, the abundance was low. NanoHighFLR high abundance was also detected in WM3, forming a large patch in offshore waters of the WEC (Fig. 5G), decreasing westward and eastward, showing an increase in a restricted area in the Bay of Seine. Microphytoplankton abundance (Fig. 5H) was low out of the English Channel. Then, patches of high abundance were observed in western WM3, in offshore waters of the WEC. In the CEC and BOS, the abundance was low.

The abundance of each group was compared with respect to the distance of the inner WEC thermal tidal front used as an arbitrary geographical reference (Ushant front, Fig. 6). Samples located to the West of the front were represented by a negative distance whereas samples located to the East of the front were represented by a positive distance. A global view revealed that abundance increased as the sample got collected closer to the Ushant frontal area (Fig. 6). This was the case for PicoHighFLR (Fig. 6C), Cryptophyte-like cells (Fig. 6E), and NanoLowFLR (Fig. 6F). On the other hand, NanoHighFLR (Fig. 6G) and Microphytoplankton groups (Fig. 6H) showed maximum abundance slightly offset (westward) of the front (microphytoplankton also showing high values all along the front). For these groups (PicoHighFLR, Cryptophyte-like cells, NanoLowFLR, NanoHighFLR and Microphytoplankton), the highest levels of abundance were recorded in WM3 which is the most stable water mass observed here. PicoLowFLR (Fig. 6B), *Synechococcus*-like cells and Coccolithophore-like cells showed a different pattern. The first two groups exhibited high abundance along and across the front in the Western English Channel and in the Celtic Seas (Fig. 6A) whereas Coccolithophore-like cells showed highest abundance only in shelf waters at the western entrance of English

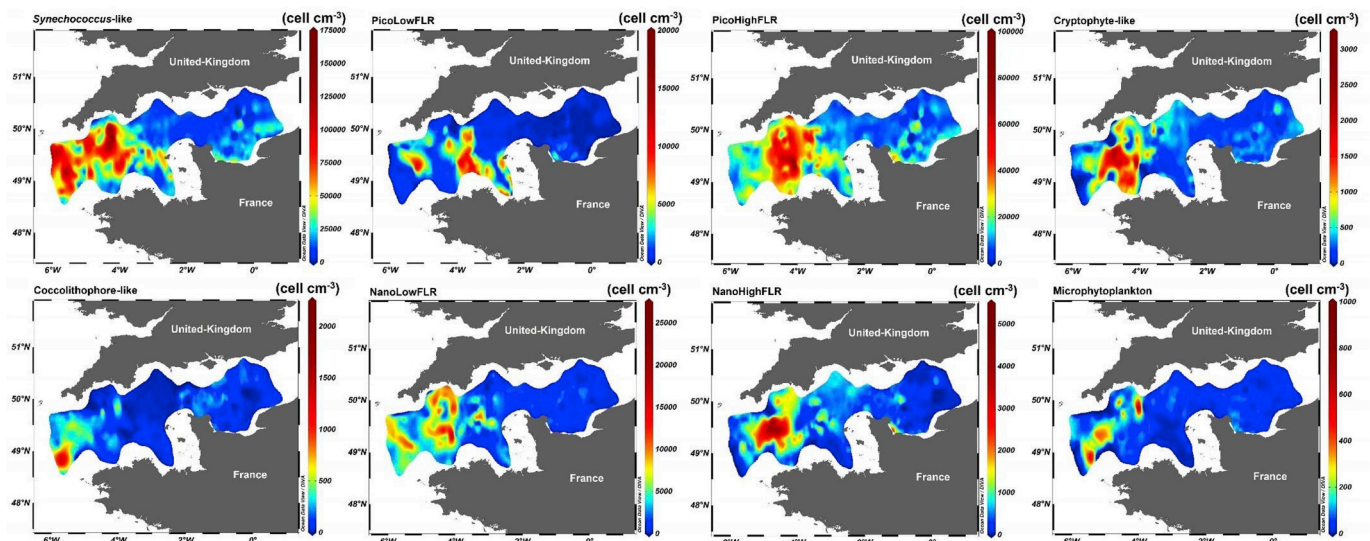


Fig. 5. Spatio-temporal distribution of the abundance of the eight phytoplankton groups characterised by the PSFCM.

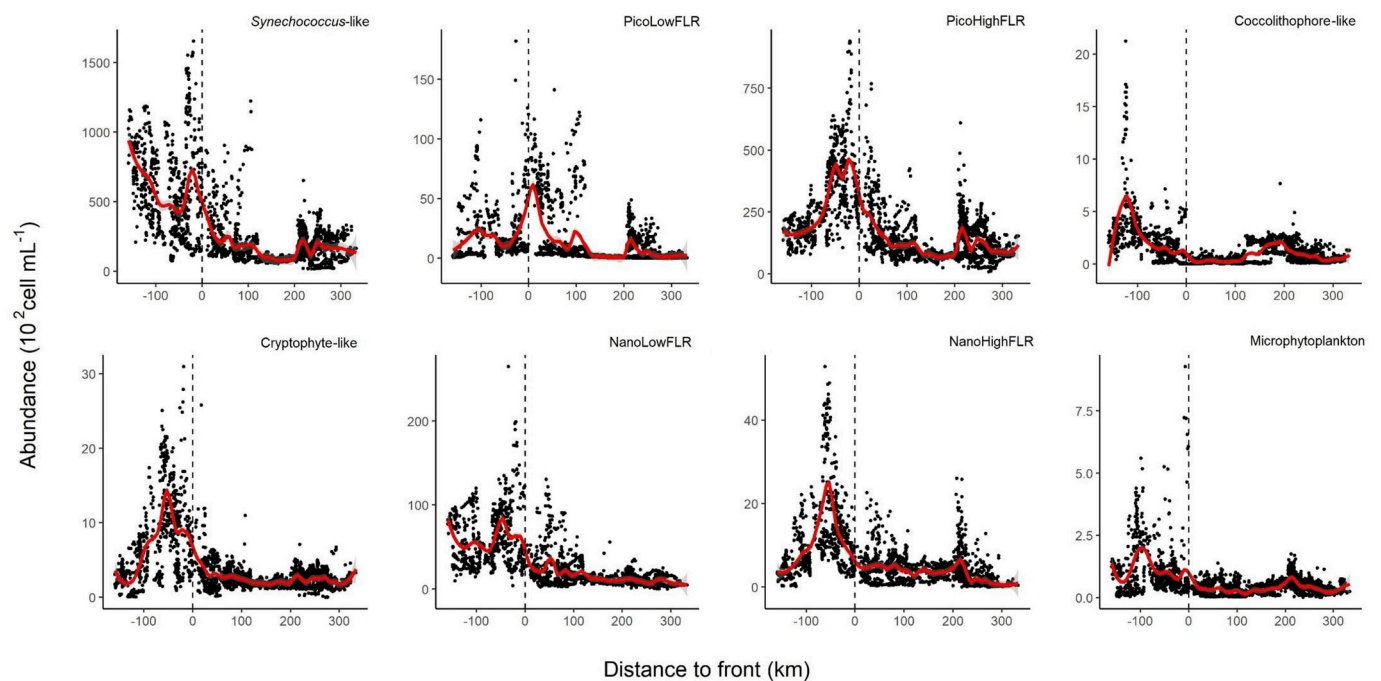


Fig. 6. Distribution of the abundance in relation to the distance to the Ushant front (km) for the eight phytoplankton groups characterised by the CytoSense. The dashed line represents the position of the inner thermal front. Negative distance represents samples at the West of the front. Positive distance represents samples at the East of the front.

Channel (Fig. 6D) where waters remained warm and stable (outer front of the WEC). At the East of the inner front, the abundance decreased slowly to reach low values at 100 km from the main frontal system (Fig. 6). At 200 km from the front, a second increase of abundance was observed (Fig. 6) for some groups. A *Synechococcus*-like cells (Fig. 6A.), PicoLowFLR (Fig. 6B), PicoHighFLR (Fig. 6C), NanoHighFLR (Fig. 6G) and, to a lesser extent, Microphytoplankton (Fig. 6H) and Coccolithophore-like cells (Fig. 6D) showed high values compared to the remaining CEC. However, this second peak was 2–3 times lower than the one observed close to the main front and could be related to the Seine river plume.

### 3.3. Phytoplankton communities structure analysis

Phytoplankton communities were discriminated after the computation of a hierarchical classification of the quantitative Jaccard index on abundance and red fluorescence (Fig. 7). The Analysis of Similarity (ANOSIM) provided evidence of a spatial clustering of 6 communities ( $R = 0.50$ ,  $P = 0.001$ ). However, due to discontinuity between the community C5, we split C5 in C5a and C5b for the investigation of the spatial scale analysis. C1 and C2 were characterised in offshore waters between WEC and CEC (mainly eastern offshore part of WM1 and offshore WM2). C3 was found in the Central English Channel and characterised also the Eastern part of the Bay of Seine (BOS), mainly WM2 and WM5. C4 was located by the inner thermal front (Fig. 4B). C5 community was found in



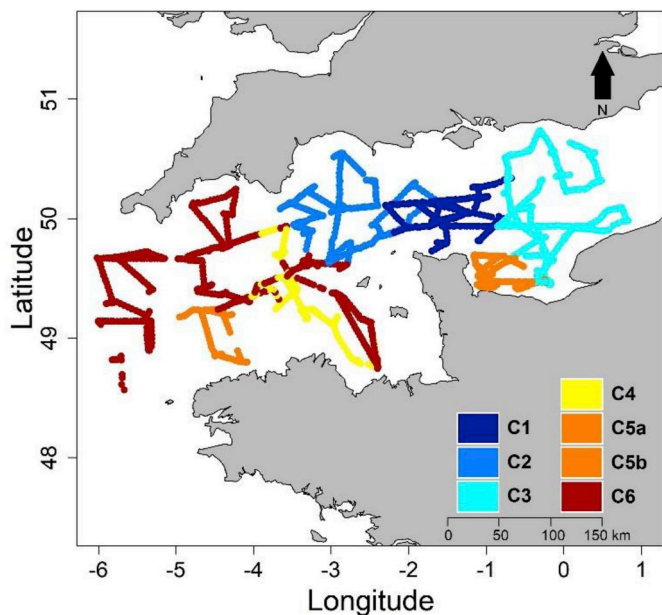


Fig. 7. Phytoplankton communities based on the results of the fusion between Jaccard similarity matrice on the abundance and red fluorescence. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the Western part of the BOS (WM4; C5a) and also in the French part of the WEC (WM3; C5b). C6 corresponded to most of the WEC offshore waters (WM3) including external Channel stations (western part of WM1).

Heterogeneity was supported by the values of the coefficient of variance (CV) calculated for each group, in addition, to minimum, maximum of abundance and total red fluorescence (further details in supplementary table A1). In terms of abundance (Fig. 8), phytoplankton

communities were all dominated by the *Synechococcus*-like group (47% in C5 to 61% in C6 to the total abundance). Picoeukaryotes (i.e. PicoLowFLR and PicoHighFLR) groups represented the second most important groups (Fig. 8). However, in C1, C2, C3 and C5, the PicoLowFLR (36% in C3 to 43% in C5) dominated over the PicoHighFLR (1% in C1, C2 and C3 to 3% in C5) whereas in C4 and C6, the PicoHighFLR (24% and 34% respectively in C4 and C6) dominated over the PicoLowFLR (7% and 13% respectively in C6 and C4). On the other hand, the total abundance of nanoeukaryotes was always low (at most they represented 11% of the total abundance for C1). The most abundant nanoeukaryotes group was NanoLowFLR (3% in C3 and C4 to 7% in C1). In C2, the Cryptophyte-like cells total abundance was the double than in any other assemblages. The most important contribution of the Coccolithophore-like cells was found in C1 (1%) whereas in the other communities they accounted for less than 1%. Finally, the total abundance of the microphytoplankton in every community was below 1%.

Although small photoautotrophs significantly dominated abundance (Fig. 8) in both WEC and CEC during the cruise, the contribution of nanoeukaryotes and microphytoplankton to total red fluorescence, which is an estimation of chlorophyll *a* fluorescence (Haraguchi et al., 2017), was important (supplementary table A1, Fig. 8). The relative contribution of the Coccolithophore-like cells to the total red fluorescence was almost seven times higher in C1 than in any other community. On the other hand, nearly half of the total red fluorescence in C3 and C4 was attributed to *Synechococcus*-like and picoeukaryotes groups (C3: 49% and C4: 50%). This was higher than in the other communities (range between 25% in C6 to 34% in C1 and C2). In C1, C2, C3 and C5, Cryptophyte-like cells total red fluorescence represented the double (12–13%) of what they represented in C4 and C6 (respectively 5% and 6%). In C3, C4 and C6, NanoLowFLR contribution to the total red fluorescence (respectively C3: 17%; C4: 27% and C6: 32%) was higher than the contribution of the NanoHighFLR (C3: 8%; C4: 13% and C6: 29%). We noticed the opposite pattern in C1, C2 and C5. Despite the low abundance of the microphytoplankton group, the contribution to total red fluorescence of this group was comprised between 4% (C4) and 15%

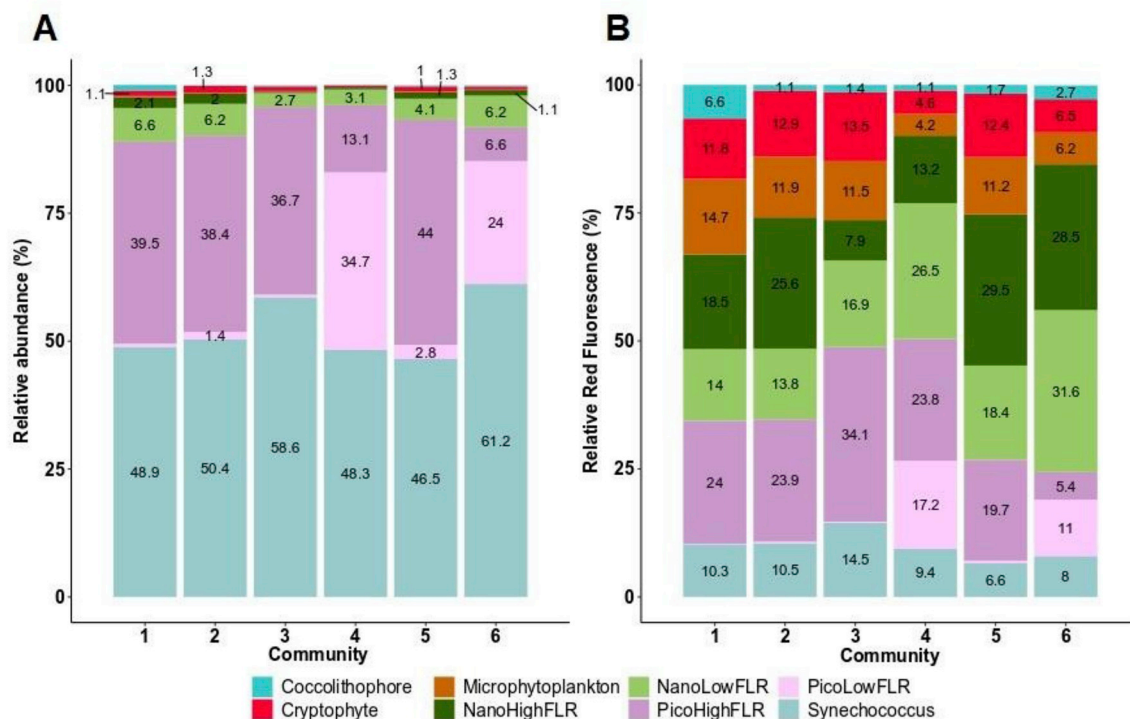


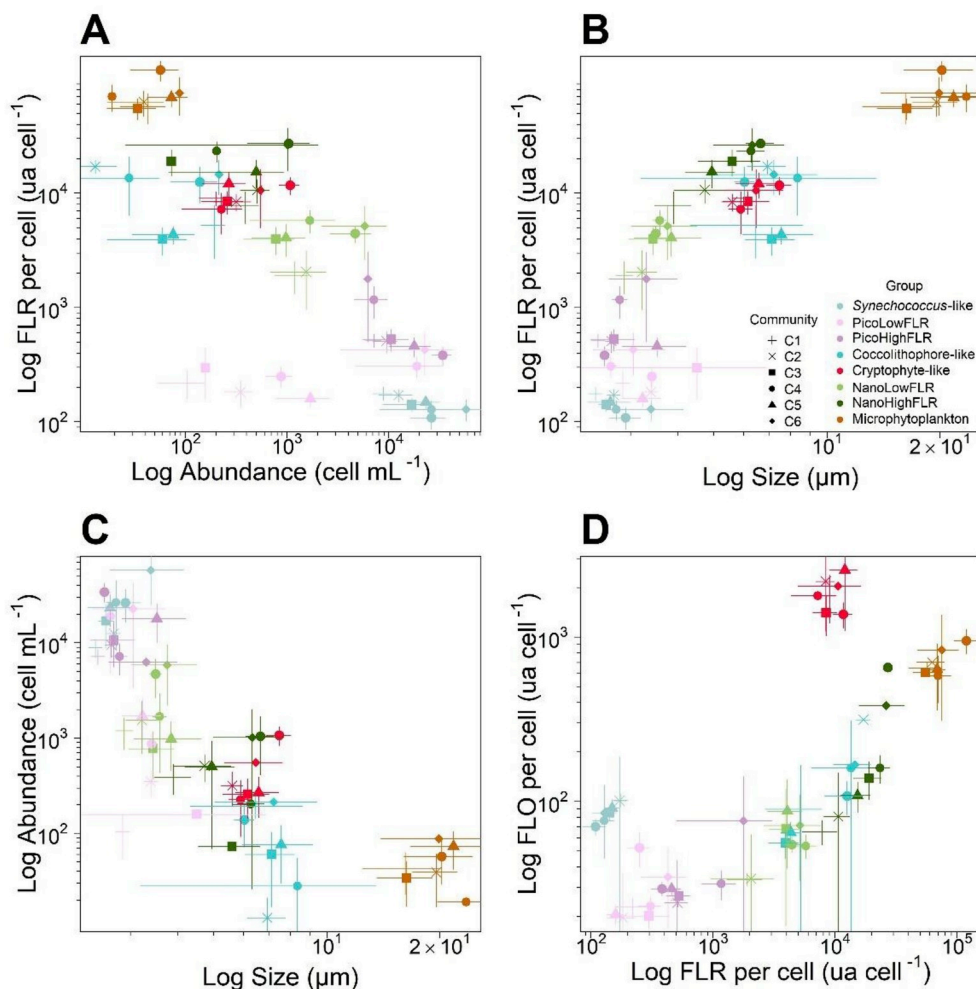
Fig. 8. Relative contribution of phytoplankton, A. abundance and B. total red fluorescence, within each community. Only the percentage above 1% are displayed. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(C1).

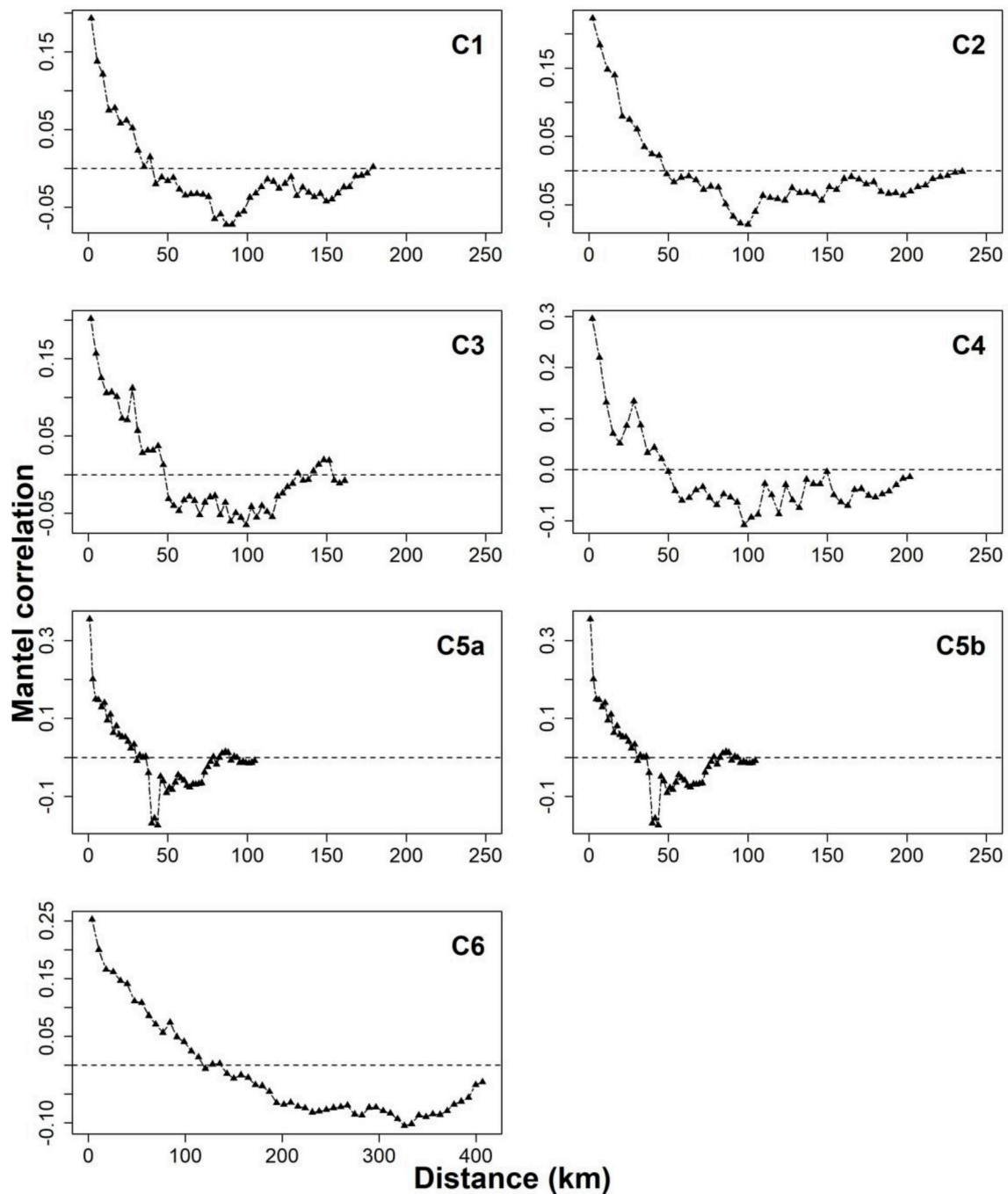
Although we observed an heterogeneity in total red fluorescence per cluster, the CytoSense provided us with information on single-cell level features (Fig. 9). Therefore, working at the individual level led us to study the population variability considering a cytometric-derived trait. Here, we first focused on the red fluorescence per cell and then on the cell-size. Different spatial patterns of red fluorescence per cell and cell size were observed, per group, among the communities. *Synechococcus*-like red fluorescence per cell remained unchanged in all the communities despite changes in cell size and abundance (Fig. 9 A and B). Cell size was significantly different between all the communities identified ( $p < 0.01$ ). Both picoeukaryote groups (*i.e.* PicoLowFLR and PicoHighFLR) exhibited the most important red fluorescence per cell in C4 and C6 than in the other communities ( $p < 0.05$ ). For the PicoLowFLR, the community comparison showed a large range of abundance within an order of magnitude of  $10^2$  cell  $\text{mL}^{-1}$  whereas red fluorescence level remained between 200 and 400 a.u.  $\text{cell}^{-1}$  (Fig. 9A). An increase in the red fluorescence per cell was observed with an increase of the cell size (Fig. 9B). On the contrary, for the PicoHighFLR, high red fluorescence levels were consistent with low abundance (Fig. 9A) and different relation between red fluorescence and cell size were observed (Fig. 9B). Small cell with high red fluorescence levels were found in C4 and C6. Small cell with low red fluorescence were found in C1, C2 and C4 and large cell with some level of red fluorescence were found in C3. Concerning Cryptophyte-like cells and Microphytoplankton groups, the highest red fluorescence values per cell were found in C5 and C6 and were significant ( $p < 0.05$ ). In these communities, the Cryptophyte-like

cells exhibited also the highest abundance (Fig. 9A and B) and their cell size was significantly larger in C4, C5 and C6 than in C1, C2 and C3 ( $p < 0.05$ ). Coccolithophore-like cells showed higher red fluorescence per cell in C2, C4 and C6 than in C1, C3 and C5. Moreover, the highest values of red fluorescence per cell were observed for NanoLowFLR and NanoHighFLR in C4, C5 and C6. Finally, larger cell size was recorded in C4, C5 and C6 than in C1, C2 and C3 for PicoLowFLR, Coccolithophore-like cells, NanoLowFLR and NanoHighFLR, but no pairwise assemblage was significantly different. The log-log relation between red fluorescence and orange fluorescence, per cell, showed an increase in fluorescence emission with the cell size (Fig. 9B). In addition, there was an increase in the red and orange fluorescence emission as the cell size increases (Fig. 9D) despite the standard deviation showed large variation for the orange fluorescence.

For red fluorescence, three orders of magnitude were recorded from the smallest (*Synechococcus*-like cells) to microphytoplankton cell size. *Synechococcus*-like and Cryptophyte-like cells could be characterised by a higher orange over red ratio from the other groups. However, not all groups subscribed to this relation. Indeed, Fig. 10B showed that some groups exhibited a change in size but not in red fluorescence per cell (range of the standard deviations). This occur in specific communities or in each community. For example, PicoHighFLR exhibited a large range of cell size and red fluorescence in C6 and C1 whereas the size and the red fluorescence were fluctuating irrespective to each other in the rest of the communities. Such patterns were also observed for the Coccolithophore-like cells. This relation would mean that in some case the red fluorescence per cell is independent of the size of the cells. As



**Fig. 9.** Patterns in size structure and fluorescence of phytoplankton groups amongst different communities defined in the English Channel. A. Log-log relationship between phytoplankton abundance and the red fluorescence per cell, per group and per community, B. Log-log relationship of the red fluorescence per cell (FLR) against the phytoplankton size scaling per group and per community, C. Log-log relationship between phytoplankton cell size and abundance per group and per community, D. Log-log relationship of the orange fluorescence per cell (FLO) against the red fluorescence per cell (FLR) per phytoplankton group and per community. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 10.** Mantel Correlogram of pairwise similarity in phytoplankton communities (Jaccardized Czekanowski similarity based on the abundance and average total red fluorescence per cluster) against geographical distance (Euclidean distance).

chlorophyll *a* fluorescence reflects the endogenous concentration of this pigment, the relation between red fluorescence per cell and cell size may result different intracellular pigment composition (Álvarez et al., 2017). On the other hand, the other groups (*i.e.* *Synechococcus*-like cells, PicoLowFLR, nanoeukaryotes, microphytoplankton and Cryptophyte-like cells) tended to show a balance between the size and the red fluorescence, the larger a cell was, the more red fluorescence it would emit. Finally, the range of the standard deviation in red and/or orange fluorescence emission showed that the emission of red fluorescence per cell within PicoLowFLR, PicoHighFLR, NanoLowFLR, NanoHighFLR, Cryptophyte-like cells and Coccolithophore-like cells groups were not proportional to the emission of orange fluorescence per cell. On the contrary, the emission of red fluorescence per cell was proportional to

the emission of orange fluorescence per cell concerning *Synechococcus*-like cells and Microphytoplankton (Fig. 9D).

### 3.4. Variance partitioning

Results of the variance partitioning (pure spatial, pure environmental, interaction between environment and space and unexplained variance) of the whole phytoplankton community and of each of the six assemblages were summarized in Table 2. Such analysis revealed that spatial (PCNM spatial descriptors) and environmental variables (temperature, salinity and turbidity) accounted for 65% of the total variance on the whole cruise. The 35% of the residual variance (*i.e.* unexplained variance) were explained by other factors than environmental variables



**Table 2**

Variation partitioning of phytoplankton community (Environment including temperature, salinity and turbidity; space including abiotic interactions, physical processes and unexplained environment).

	Environment		Space		Interaction		Residual
	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	R <sup>2</sup> Adj.	p-value	
All	0.26	0.001	0.65	0.001	0.26	0.001	0.35
C1	0.15	0.001	0.25	0.001	0.13	0.06	0.60
C2	0.19	0.001	0.51	0.001	0.16	0.001	0.47
C3	0.59	0.001	0.60	0.001	0.43	0.001	0.34
C4	0.45	0.001	0.43	0.001	0.36	0.001	0.49
C5	0.35	0.001	0.44	0.001	0.27	0.001	0.48
C6	0.50	0.001	0.70	0.001	0.46	0.001	0.26

and space (e.g. biological processes such as grazing, infection without interaction with the environmental data; Table 2). The spatial descriptors (based on the spatial coordinates of sampling points) were more important than the environmental variables (<5% for all the groups) in structuring the abundance and total red fluorescence of each group. The spatial descriptors ranged between 24% (Coccolithophore-like cells) and 34%–36% (all the other groups). The results were provided in the supplementary table A2. Focusing on the communities, the spatial variation of the assemblages was higher than the environmental variation within C1, C2, C3, C5 and C6. In community C4, the environmental variation accounted for 45% and was similar to the spatial variation which accounted for 43%. Then, the spatially structured environment (*i.e.* interaction) accounted between 13% (C1) and 46% (C6) of the total variation. Finally, considering the six communities identified (C5a and C5b are merged), both spatial and environmental variables accounted for a significant amount of variation except for the effect of the interaction between environment and space in C1. The sum of pure spatial, pure environmental variables and their interaction explained from 40% (C1) to 74% (C6) of the total variation in the communities. Therefore, the percentage of unexplained variation in the phytoplankton assemblages was comprised between 26% (C6) and 60% (C1).

### 3.5. Scale of variability of phytoplankton communities

The multivariate Mantel correlogram based on the abundance and the average total red fluorescence per cluster revealed phytoplankton communities' spatial pattern by computing the geographical distance between pairs of sites in each community (Fig. 10). The Mantel correlogram indicated the highest autocorrelation at nearer distances, with a decrease and always reaching negative values at farther distances (but not always at the same distance). Because C5 community was not spatially continuous, C5 community was split into C5a (Eastern Bay of Seine) and C5b (South-Western of the WEC) sub-groups. The highest autocorrelation was found in C4 and C5b ( $r = 0.34$  and  $r = 0.40$ , respectively). Phytoplankton assemblages showed a positive spatial autocorrelation between 20 km (C5a) and 110 km (C6, Fig. 10). This meant that phytoplankton composition became more different when the autocorrelation reached null or negative values. The definition of the spatial scale resulted in the combination of high correlation for the nearer distances and the quick decrease of the correlation when the distance increased. Here, the results suggested a high spatial structure at sub-mesoscale (<10 km) up to 110 km. This analysis confirmed the results of the partitioning variance analysis which mentioned that space had a great influence in structuring the assemblages.

## 4. Discussion

### 4.1. Water masses

Despite the English Channel is a rather well-studied area, only few surveys attempted to characterise the spatiotemporal distribution of

physicochemical parameters in the CEC and WEC (Bentley et al., 1999; Charria et al., 2016; Garcia-Soto and Pingree, 2009; Napoléon et al., 2014, 2012). Most studies benefited of long-term coastal monitoring or transect of ships-of-opportunity through a year. In the present study, the focus was put in the whole Western and Central English Channel gridded at a specific period of a year. Although the sampling strategies differed, our results showed similar hydrological areas than previous studies. The water circulation from West to East in the English Channel explained the longitudinal gradient observed during our study especially for the slow salinity decrease (Salomon and Breton, 1993). In addition to this circulation, the vertical stability induced during summer, contributed to the longitudinal gradient of temperature. Along the English coast of the Central English Channel, the high values of turbidity were congruent with continuous run-off from the Solent and were entertained in the gyre of the Southern part of the Isle of Wight (Ménésquen and Gohin, 2006). During the CAMANOC cruise, strong horizontal gradients of temperature, salinity and turbidity revealed five distinct water masses. The temperature gradient revealed tidal mixing fronts where a strong stratification occurred (Simpson and Nunes, 1981). The stratification of the Ushant frontal area (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Pingree, 1980; Pingree et al., 1975; Pingree and Griffiths, 1978) separated 2 water masses (WM). WM3 corresponded to Western English Channel (WEC) waters displaying mixed water column, lower temperature and higher salinity than the rest of the waters of the outer Channel (shelf front) and the eastern WEC. WM3 was surrounded by stratified waters. The western boundary corresponded to an external front separating warm and stratified waters (Celtic Seas shelf waters) from mixed and cold waters (WM3). At the east, an internal front separated cold and mixed waters (WM3) from warm and well-mixed waters (WM1). The temperature pattern observed in the offshore waters was not consistent with observation in 2011 (Marrec et al., 2013; Napoléon et al., 2013) but was congruent with negative anomaly observed in 2012 in the northern part of the WEC (Marrec et al., 2014). We explained that by a combination of a relatively higher stability of water in WM3 (low tidal stream) than in the CEC (high tidal stream) and the lower temperature which are supported by air-sea heat fluxes shifting from positive to negative balance during the summer-autumn transition. Thus, the upper mixed layer deepens and water cools down (Hoch and Garreau, 1998). WM1 was characterised by high stable temperature and salinity (Fig. 4B). It might have corresponded to the external front separating the WEC and the Celtic Seas in the Western border and the internal front between the WEC and the CEC in the Eastern border. A latitudinal salinity gradient revealed a salinity front separating WM4 found in the Bay of Seine (BOS) from the CEC waters (WM2). The turbidity gradient separated the offshore waters of the CEC from English coastal waters of Central English Channel (WM5). The low values of  $N^2$  in WM4 (BOS) resulted from permanently mixed waters even under the influence of the run-off of the Seine River (Bay of Seine; French coast) whereas WM5 might have been under the remote influence of the Solent (English Coast), leading to a slight dilution of coastal waters (compared to lower salinities recorded in the Bay of Seine). WM2 could result in intermittently stratified waters (Van Leeuwen et al., 2015) in the continuity of WEC stratified waters.

### 4.2. Phytoplankton communities

Several studies attempted to numerate phytoplankton assemblages in the whole area of the WEC and CEC but none of them with high spatial (Garcia-Soto and Pingree, 2009; Napoléon et al., 2014, 2013, 2012) expanded gridding of data or on high temporal resolution (Edwards et al., 2001). Furthermore, in this area, while previous studies focused only on species of the large size fraction of the phytoplankton (*i.e.* microphytoplankton; Napoléon et al., 2014, 2012; Smyth et al., 2010; Tarran and Bruun, 2015; Widdicombe et al., 2010), we were able to detect the whole size-range of phytoplankton from picophytoplankton (1  $\mu\text{m}$ ) to large microphytoplankton (several millimeters length) in a single analysis. Even though we did not reach a taxonomical resolution,

it was possible to address the fine structure of phytoplankton functional groups, as well as some of their traits, during the summer-autumn transition.

In this study, we used the CytoSense parameters derived from the optical features and signatures as cytometric-derived traits at the individual and populational level (Violle et al., 2007) while several studies were applying the same technique and approach in different aquatic ecosystems focusing only one level (Fragoso et al., 2019; Malkasian et al., 2011; Pomati et al., 2011; Pomati and Nizzetto, 2013). The four selected traits (abundance per group, orange and red fluorescence per cell and cell size) showed a spatial heterogeneity for each group, between the communities (Litchman et al., 2010). The cell size was independent of cell's physiology per group between our communities (larger cells and higher average red fluorescence per cell in the community of the WEC, C4 and C6 than in the communities of CEC and BOS, C1, C2, C3 and C5). This result suggests specific responses of the species and/or groups. Indeed, in order to explain the spatial heterogeneity of the traits, we propose three hypothesis: (i) the selection of the optimal traits under biological pressures such as grazing (Litchman et al., 2009); (ii) the plasticity and genetic adaptation of the traits derived from the gene expression in response to environmental variations (Litchman et al., 2010) and; (iii) in the case of the automated "pulse shape" flow cytometry, a group can pool several species with similar optical properties (Thyssen et al., 2008a). Here, as grazers were not recorded continuously, we decided not to discuss about this hypothesis but would rather investigate the two others.

First, we suggest that the main drivers of the spatial variations are the temperature and the vertical stability of water masses. The results showed that PicoLowFLR group, Cryptophyte-like cells, nanoeukaryotes and microphytoplankton of the communities characterizing stratified and warm waters (C4) and mixed and cold waters (C6) exhibited the largest average cells size and the highest red and orange fluorescence per cell. Because the optimum for growth range of both nanoeukaryotes and microphytoplankton is relatively low, the colder temperatures measured in WM3, characterised mainly by C6, might have contributed to enhance their metabolism, hence, their size (Marañón, 2015). On the contrary, despite small phytoplankton (picophytoplankton) are dominant everywhere at this period, their growth is facilitated in water masses exhibiting high temperature values (C1 to C5, all WM except WM3). Indeed, their temperature optimum for growth range is higher than nano-phytoplankton and microphytoplankton optimum growth range and should favor them in those conditions. Thus, in water masses exhibiting cold water, we expect a dominance of larger cell size whereas in warmer waters a dominance of the smaller cell size within a group. Although, nutrient and grazing rate were not available at the same spatiotemporal resolution as the biological data, we are aware that both play a role on cell size as well as their physiology. In the first case, the growth of small cells (*i.e.* *Synechococcus*-like cells and picoeukaryotes) is favored against large cells (*i.e.* microphytoplankton) under low nutrient condition (usually from the end of the spring bloom to fall). Then, biological interactions (grazing, parasitism) are usually to impact cell size (Bergquist et al., 1985; Marañón, 2015) and physiology (Litchman, 2007; Litchman et al., 2010; Litchman and Klausmeier, 2008). Finally, size over-estimation of *Synechococcus*-like cells and picoeukaryote (Fig. 9) results of technical drawbacks of flow cytometry. It is attributed to the halo effect of the laser which increased as particle were increasingly smaller than the width of the laser beam (*i.e.* 5  $\mu\text{m}$ ).

The heterogeneity of environmental conditions within a water mass affect the expression of the traits within each group. For example, the Coccolithophorids are known to prefer warm and stable waters (WM1) for their growth. Here, the PSFCM detected high total abundance of this group in the Celtic Seas shelf, out of the English Channel (WM1, Figs. 5 and 6) which are dominated in this range of abundance by *Emilinia huxleyi* (Garcia-soto et al., 1995). On the contrary, microphytoplankton (including some diatoms and dinoflagellates) are known to grow and exhibit higher size in cold waters, turbulent system, rich in nutrient. This

explanation is also true for the nanoeukaryotes (*i.e.* NanoLowFLR and NanoHighFLR). This is congruent with the WM3 and WM4 being influenced by the Seine river (C5) and both by the Atlantic Ocean waters and the Seine River (C3). They both contribute to provide nutrients. In addition, the low vertical water stability observed in the coastal communities (along the French coast of Brittany, Bay of Seine) could increase small-scale turbulence which might be positive for some groups (microphytoplankton, Cryptophytes-like, nanoeukaryotes) by increasing nutrient transport (Karp-Boss et al., 1996).

On the other hand, all the groups exhibited different levels of red and orange fluorescence per cell between the communities, except *Synechococcus*-like cells which showed the same levels across the communities (Fig. 9A, B and D). The fluorescence emission given by each group is dependent on the physiological states of the cells. The quantum yield of the chlorophyll *a* fluorescence (*i.e.* red fluorescence of the PSFCM) and phycobilin and phycoerythrin (*i.e.* orange fluorescence of the PSFCM) is also dependent to the life cycle of the cells leading to high fluorescence for young and efficient cells whereas lysis is decreasing the fluorescence emission. Another point was linked to the atmospheric conditions during the cruise. At the beginning of the cruise (corresponding mainly to communities C6, C5 and C4 in WEC waters), the weather was sunny and without wind, some groups (picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton) showed high variability in orange fluorescence per cell within a single community. The strong light intensity and the high stability might have resulted in the synthesis of photoprotective pigments. However, the change of weather after half of the cruise (while investigating WM3 and C1) might have enhanced the vertical mixing. Therefore, the position of phytoplankton cells of the groups is permanently engendered by the mixing of the water column which do not induce production of photoprotective pigments.

Finally, the last case concerns the lack of taxonomical resolution of the automated "pulse shape-recording" flow cytometer. Indeed, our number of groups was limited. By sharing similar optical properties, several species are attributed to a same cluster. In WEC waters, flow cytometry surveys showed that picophytoplankton is usually composed of Prasinophyceae and usually dominated by *Ostreococcus* sp. at this period of the year (which are considered as red picoeukaryotes by flow cytometry). In addition, among the cryptophytes, few genera exhibiting a wide size range (between 5 and 19  $\mu\text{m}$ ) are commonly detected (Marie et al., 2010). Nanoeukaryotes are frequently represented by Haptophytes, Stramenopiles and Chlorophytes. *Emilinia huxleyi* is always reported as the dominant coccolithophore species and is known to bloom in the outer shelf of the WEC (Garcia-soto et al., 1995). In addition, a high diversity of diatoms and dinoflagellates is also observed in the WEC (*e.g.* Widdicombe et al., 2010). Such taxonomical diversity results also in size diversity which is related to physiological traits (Litchman et al., 2010). Consequently, the pigment expression varies. Here, the variations of the trait's expression considering the three hypotheses (the plasticity and genetic adaptation of the traits, the selection of the optimal traits under biological pressures and the lack of taxonomical determination by automated "pulse shape-recording" flow cytometry) lead to changes in related traits such as nutrient uptake, cell carbon and nitrogen content within each groups and between the communities. The fact that traits such as the cell-size, abundance and total or per cell red fluorescence per group differed significantly between communities, suggests optimum growth conditions in the recorded abiotic parameters for their growth combined with trade-off in biological pressure and variations of the taxonomical composition.

#### 4.3. Environment vs. spatial variations

We expected a greater influence of environment over space structuring phytoplankton communities in the English Channel. Indeed, abiotic filtering has been shown to play a key-role in shaping phytoplankton assemblages (Cornwell and Ackerly, 2015). However, in the present study, variation partitioning showed that variability in each



community depended more on spatial (25–70%) than on environmental (15%–59%) variation within space inducing significantly the environmental variations (16%–46%; Table 2). Despite heterogeneity is well reported in other areas and seas (Bonato et al., 2015; Marrec et al., 2018; Thyssen et al., 2015), our study allowed quantifying the importance of space and environment on high frequency flow cytometry. Here, the spatiotemporal study of the phytoplankton communities showed an imbalance between groups over one location, this means that high abundance of a group coincided with low abundance of another group and vice-versa. For example, the highest abundance of Coccolithophore-like cells was observed out of the English Channel, in the Celtic Seas shelf where none of the other groups (except *Synechococcus*-like cells) exhibited highest abundance (Fig. 5). This was observed also for both picoeukaryote groups, the highest abundance of the PicoLowFLR was found where PicoHighFLR abundance was relatively low and vice-versa. NanoLowFLR and NanoHighFLR showed the same trend. As previously shown with temperature and vertical stability, each group might result of the selection by a combination of the best conditions (environmental, physical and biotic interactions) for their growth, metabolism and access to resources thus defining their ecological niche (Margalef, 1978; Reynolds, 2006, 1994; 1984; Tilman et al., 1982). Despite *Synechococcus*-like cells share the same environmental niche as picoeukaryotes (Chen et al., 2011), we could identify some spot of exclusion on both sides near the Ushant front between *Synechococcus*-like cells and PicoLowFLR and others between *Synechococcus*-like cells and PicoHighFLR which are consistent either with sharing niche (Chen et al., 2011) either with exclusions (Winder, 2009). However, both studies considered only one picoeukaryotes group and analysed discrete samples while we could characterise at a high spatial and/or temporal resolution two sub-groups in the picoeukaryotes and *Synechococcus*-like cells. Consequently, the characterization of sub-groups may increase the ecological understanding of plankton functional groups. As previously discussed, phytoplankton traits are also known to partition ecological niche of species or functional groups (Litchman et al., 2010; Litchman and Klausmeier, 2008). Therefore, by extension, cytometry-derived traits (Fragoso et al., 2019; Malkassian et al., 2011; Pomati et al., 2011; Pomati and Nizzetto, 2013) are important to be taken into account when considering the spatial and/or temporal ecological niche of the functional groups.

#### 4.4. Spatial structure analysis

Based on the Mantel correlograms (Fig. 10), phytoplankton communities are autocorrelated from small to large scale (20 km–110 km), depending on the communities. The highest correlation at nearer distance followed by the decrease in autocorrelation define a stronger structure for closer sampled units. Due to the high spatial resolution between two sampling units (*i.e.* 3.4 km), we state phytoplankton communities to be structured at the sub-mesoscale (1–10 km). The local structuration is also supported by the maps of each phytoplankton group (Fig. 5), their distribution with respect to the Ushant front (Fig. 6) and the coefficient of variation (Table 2), which highlighted heterogeneity and sharp shifts of total abundance, confirming a local structuration. This measure on the field was congruent with previous findings using conventional flow cytometry (Martin et al., 2005), remote sensing (d'Ovidio et al., 2010) and modelling (Lévy et al., 2014; Mahadevan et al., 2012). The positive autocorrelation found for each community reflects the size of the patches for communities. Several physical processes are well reported to generate patchiness. Small scale turbulence are well-known to generate patchiness which can concentrate particles and phytoplankton at very small scales (Schmitt and Seuront, 2008). Indeed, Pingree (Pingree, 1980; Pingree and Griffiths, 1978) noticed that the English Channel is characterised by small turbulent and persistent eddies. Because phytoplankton moves passively due to the movements of the fluids, eddies can generate patchiness of phytoplankton and spatial heterogeneity. This is commonly observed in the

North Atlantic Ocean in the Western English Channel and the Bay of Seine (Mahadevan et al., 2012; Ménesguen and Gohin, 2006; Pingree et al., 1978; Salomon and Breton, 1993) as in our study, despite we could not observe the eddies. In the meanwhile, eddies contribute locally to water masses motion, changing the abiotic conditions which allow a niche specialization (d'Ovidio et al., 2010). The association of the front in the Western English Channel and the eddies frequently reported in the area are described to generate sub-mesoscale turbulence (*i.e.* 1–10 km; Bracco et al., 2000; Perruche et al., 2011). This latter and the passive transport of phytoplankton cause the important dispersal rates of phytoplankton (Lévy et al., 2014). In our study, Fig. 4D defined the position of the fronts during the cruise and Fig. 6 showed the distribution of each cytometric group with respect to the inner front. The dispersal rates reflected here the heterogeneity in abundance around the front. Moreover, the English Channel is highly hydrodynamical, exhibiting a heterogeneity between French and English coasts, Bay of Seine and offshore waters in the strength of the tidal stream. This component also induces the strength of the dispersal rate. Finally, high variability in each group's traits, inside each community, may also result in the spatial variation of the strength of the dispersal, which increased the plasticity (Sultan and Spencer, 2002; Via and Lande, 1985) thus the variability of their traits (Litchman et al., 2010).

## 5. Conclusion

In the present study, six phytoplankton communities were characterised based on the contribution of each of the eight defined cytometric groups and their optical features and signatures, total abundance and chlorophyll content. These optical features can be, to some extent, associated to life traits, from coastal to offshore waters, where long term regular monitoring does not exist. Phytoplankton and their derived traits were strongly dependent on the hydrology but, most of the times, the communities were even more structured by the spatial descriptors. They include parameters which are not taken into account in the environmental part such as positive and negative biological interactions, other unmeasured environmental parameters, physical processes. Mantel correlogram made possible to identify phytoplankton communities' variations at the sub-mesoscale (1–10 km) in the English Channel. Physical parameters were proposed to explain these variabilities, by structuring the hydrology (different water masses) as well as phytoplankton communities, which were not always associated to a single water mass. Further work should investigate the traits responses to the environmental conditions by applying high frequency flow cytometry in a regular basis, if possible, connected to automated hydrological and biogeochemical measurements at high frequency, on a seasonal and interannual basis. We could therefore define an extended phytoplankton typology within the English Channel including all size classes and also their corresponding traits. This work requires analysing data from the three tables (species or functional groups, environment and traits) and have already been proposed for automated flow cytometry in previous studies (Breton et al., 2017; Fragoso et al., 2019; Pomati et al., 2013) and should be generalized from individuals to the community level.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was carried out in the frame of the M.Sc. FOGEM (Université du Littoral-Côte d'Opale and Université of Lille) internship co-funded by the Laboratory of Oceanology and Geosciences and the "Pôle Environnement, Milieux Littoraux et Marins" of ULCO. At present Arnaud Louchart benefits of a PhD grant of the Université du Littoral-Côte d'Opale and the French Region « Hauts-de-France ». The CAMA-NOC cruise was funded by the DFF project. We would like to thank

Morgane Travers, P.I. of the CAMANOC cruise, the scientists involved, as well as the Captain and the crew of the R/V Thalassa (IFREMER).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.csr.2020.104056>.

## References

- Alpine, A.E., Cloern, J.E., 1988. Phytoplankton growth rates in a light-limited environment, San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 167–173.
- Álvarez, E., Nogueira, E., López-Urrutia, A., 2017. In vivo single-cell fluorescence and size scaling of phytoplankton chlorophyll content. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–16. <https://doi.org/10.1128/aem.03317-16>.
- Bentley, D., Hart, V., Guary, J.C., Statham, P.J., 1999. Dissolved nutrient distributions in the central English channel. *Cont. Shelf Res.* 19 [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(99)00054-0).
- Bergquist, A.M., Carpenter, S.R., Latino, J.C., 1985. Shifts in phytoplankton size structure and community composition during grazing by contrasting zooplankton assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 30, 1037–1045.
- Bonato, S., Breton, E., Didry, M., Lizon, F., Cornille, V., Lécuyer, E., Christaki, U., Artigas, L.F., 2016. Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore-offshore gradients using flow cytometry: a case study in the eastern English Channel. *J. Mar. Syst.* 156, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.11.009>.
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., 2015. High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area. In: *Springer: The Eastern English Channel. Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 154, pp. 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.eccs.2014.12.037>.
- Borcard, D., Legendre, P., 2002. All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol. Model.* 153, 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.01.006>.
- Borcard, D., Legendre, P., Drapeau, P., 1992. Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73 (3), 1045–1055. <https://doi.org/10.2307/1940179>.
- Bracco, A., Provenzale, A., Scheuring, I., 2000. Mesoscale vortices and the paradox of the plankton. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 267, 1795–1800. <https://doi.org/10.1002/lipi.19660680811>.
- Breton, E., Christaki, U., Bonato, S., Didry, M., Artigas, L.F., 2017. Functional trait variation and nitrogen use efficiency in temperate coastal phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 563, 35–49. <https://doi.org/10.3354/meps11974>.
- Brylinski, J.M., Lagadeuc, Y., 1990. L'interface eaux côtières/eaux du large dans le Pas-de-Calais (côte française) : une zone frontale. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 311, 535–540.
- Charria, G., Lamouroux, J., De Mey, P., 2016. Optimizing observational networks combining gliders, moored buoys and FerryBox in the Bay of Biscay and English Channel. *J. Mar. Syst.* 162, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2016.04.003>.
- Chen, B., Wang, L., Song, S., Huang, B., Sun, J., Liu, H., 2011. Comparisons of picophytoplankton abundance, size, and fluorescence between summer and winter in northern South China Sea. *Cont. Shelf Res.* 31, 1527–1540. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.06.018>.
- Cornwell, W.K., Ackerly, D.D., 2015. Community assembly and shifts in plant trait distributions across an environmental gradient in coastal California published by : ecological society of America community across an environmental in plant trait distributions assembly and shifts gradient and. *Ecol. Monogr.* 79, 109–126. <https://doi.org/10.1890/07-1134.1>.
- Cullen, J., Ciotti, A., Davis, R., Lewis, M., 1997. Emerging technologies and modeling. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1223–1239.
- d'Ovidio, F., De Monte, S., Alvain, S., Dandonneau, Y., Levy, M., 2010. Fluid dynamical niches of phytoplankton types. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18366–18370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004620107>.
- De Monte, S., Soccodato, A., Alvain, S., D'Ovidio, F., 2013. Can we detect oceanic biodiversity hotspots from space? *ISME J.* 7, 2054–2056. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.72>.
- Dubelaar, G.B.J., Geerders, P.J.F., Jonker, R.R., 2004. High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *J. Environ. Monit.* 6, 946–952. <https://doi.org/10.1039/b409350j>.
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker, R.R., Tangen, K., 1999. Design and first results of CytoBuoy: a wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry* 37, 247–254.
- Edwards, M., Reid, P., Planque, B., 2001. Long-term and regional variability of phytoplankton biomass in the Northeast Atlantic (1960–1995). *ICES J. Mar. Sci.* 58, 39–49. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0987>.
- Eloire, D., Somerfield, P.J., Conway, D.V.P., Halsband-Lenk, C., Harris, R., Bonnet, D., 2010. Temporal variability and community composition of zooplankton at station L4 in the Western Channel: 20 years of sampling. *J. Plankton Res.* 32, 657–679. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq009>.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* (80-. ) 281, 200–206. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>.
- Falkowski, P.G., Laws, E.A., Barber, R.T., Murray, J.W., 2003. Phytoplankton and their role in primary, new, and export production. *In: Ocean Biogeochemistry*, pp. 99–121. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55844-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55844-3_5).
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* (80-. ) 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>.
- Foulon, E., Not, F., Jalabert, F., Cariou, T., Massana, R., Simon, N., 2008. Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environ. Microbiol.* 10, 2433–2443. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01673.x>.
- Fragoso, G.M., Poulton, A.J., Pratt, N., Johnsen, G., Purdie, D.A., 2019. Trait-based analysis of subpolar North Atlantic phytoplankton and plastidic ciliate communities using automated flow cytometer. *Limnol. Oceanogr.* 64, 1–16. <https://doi.org/10.1002/lno.11189>.
- García-soto, C., Fernández, E., Pingree, R.D., Harbour, D.S., 1995. Evolution and structure of a shelf coccolithophore bloom in the western English channel. *J. Plankton Res.* 17, 2011–2036. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.11.2011>.
- García-Soto, C., Pingree, R.D., 2009. Spring and summer blooms of phytoplankton (SeaWiFS/MODIS) along a ferry line in the Bay of Biscay and western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 29, 1111–1122. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2008.12.012>.
- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. <https://doi.org/10.3354/meps08564>.
- Haraguchi, L., Jakobsen, H.H., Lundholm, N., Carstensen, J., 2017. Monitoring natural phytoplankton communities: a comparison between traditional methods and pulse-shape recording flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.* 80, 77–92. <https://doi.org/10.3354/ame01842>.
- Hoch, T., Garreau, P., 1998. Phytoplankton dynamics in the English channel: a simplified three-dimensional approach. *J. Mar. Syst.* 16, 133–150. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(97\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(97)00103-6).
- Holligan, P.M., Harbour, D.S., 1977. The vertical distribution and succession of phytoplankton in the western English channel in 1975 and 1976. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 57, 1075–1093. <https://doi.org/10.1017/S002531540002614X>.
- Hydes, D.J., Wright, P.N., 1999. SONUS: The southern nutrients study 1995–1997. *Rep. Southampton. Oceanogr. Cent.*
- Iriarte, A., Purdie, D.A., 2004. Factors controlling the timing of major spring bloom events in an UK south coast estuary. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 61, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.eccs.2004.08.002>.
- Jouenne, F., Lefebvre, S., Véron, B., Lagadeuc, Y., 2007. Phytoplankton community structure and primary production in small intertidal estuarine-bay ecosystem (eastern English Channel, France). *Mar. Biol.* 151, 805–825. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0440-z>.
- Karp-Boss, L., Boss, E., Jumars, P.A., 1996. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 34, 71–107.
- Kifile, D., Purdie, D.A., 1993. The seasonal abundance of the phototrophic ciliate *Mesodinium rubrum* in Southampton water, England. *J. Plankton Res.* 5, 823–833.
- Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H., Taylor, B.E., 1986. Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the spring clear-water phase. *Limnol. Oceanogr.* 31, 478–490. <https://doi.org/10.4319/lno.1986.31.3.0478>.
- Landeira, J.M., Ferron, B., Lunven, M., Morin, P., Marie, L., Sourisseau, M., 2014. Biophysical interactions control the size and abundance of large phytoplankton chains at the ushant tidal front. *PLoS One* 9, e90507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090507>.
- Leakey, R.J.G., Burkill, P.H., Sleight, M.A., 1992. Planktonic ciliates in Southampton Water: abundance, biomass, production, and role in pelagic carbon flow. *Mar. Biol.* 114, 67–83. <https://doi.org/10.1038/470444a>.
- Lefebvre, A., Poisson-Caillault, E., 2019. High resolution overview of phytoplankton spectral groups and hydrological conditions in the eastern English Channel using unsupervised clustering. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 608, 73–92. <https://doi.org/10.3354/meps12781>.
- Legendre, P., Gallagher, D. E., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s004420100716>.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*, 2nd. Elsevier Sci. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Lévy, M., Jahn, O., Dutkiewicz, S., Follows, M.J., 2014. Phytoplankton diversity and community structure affected by oceanic dispersal and mesoscale turbulence. *Limnol. Oceanogr. Fluids Environ.* 4, 67–84. <https://doi.org/10.1215/21573689-2768549>.
- Litchman, E., 2007. Resource competition and the ecological success of phytoplankton. In: Falkowski, P.G., Knoll, A.H. (Eds.), *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Academic Press, pp. 351–375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370518-1.X5000-0>.
- Litchman, E., de Tezanos Pinto, P., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K., 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* 653, 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0341-5>.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., 2008. Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 39, 615–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173549>.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol. Lett.* 10, 1170–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01117.x>.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Yoshiyama, K., 2009. Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2665–2670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810891106>.
- Mahadevan, A., D'Asaro, E., Lee, C., Perry, M.J., 2012. Eddy-Driven stratification initiates North Atlantic spring phytoplankton blooms. *Science* (80-. ) 337, 54–58.

- Malkassian, A., Nerini, D., Van Dijk, M.A., Thyssen, M., Mante, C., Gregori, G., 2011. Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer. *Cytom. Part A* 79 A, 263–275. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21035>.
- Marañón, E., 2015. Cell size as a key determinant of phytoplankton metabolism and community structure. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 241–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015955>.
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternative in an unstable environment. *Oceanologica* 1, 493–509.
- Marie, D., Shi, X.L., Rigaut-Jalabert, F., Vaulot, D., 2010. Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 165–178. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00842.x>.
- Marrec, P., Cariou, T., Collin, E., Durand, A., Latimier, M., Macé, E., Morin, P., Raimund, S., Vernet, M., Bozec, Y., 2013. Seasonal and latitudinal variability of the CO<sub>2</sub> system in the western English Channel based on Voluntary Observing Ship (VOS) measurements. *Mar. Chem.* 155, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2013.05.014>.
- Marrec, P., Cariou, T., Latimier, M., Macé, E., Morin, P., Vernet, M., Bozec, Y., 2014. Spatio-temporal dynamics of biogeochemical processes and air-sea CO<sub>2</sub> fluxes in the Western English Channel based on two years of FerryBox deployment. *J. Mar. Syst.* 140, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.05.010>.
- Marrec, P., Doglioli, A.M., Grégori, G., Dugenne, M., Della Penna, A., Bhairy, N., Cariou, T., Hélias Nunige, S., Lahbib, S., Rougier, G., Wagener, T., Thyssen, M., 2018. Coupling physics and biogeochemistry thanks to high-resolution observations of the phytoplankton community structure in the northwestern Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 15, 1579–1606. <https://doi.org/10.5194/bg-15-1579-2018>.
- Martin, A.P., Zubkov, M.V., Burkill, P.H., Holland, R.J., 2005. Extreme spatial variability in marine picoplankton and its consequences for interpreting Eulerian time-series. *Biol. Lett.* 1, 366–369. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0316>.
- Ménèsqueun, A., Gohin, F., 2006. Observation and modelling of natural retention structures in the English Channel. *J. Mar. Syst.* 63, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2006.05.004>.
- Ménèsqueun, A., Hoch, T., 1997. Modelling the biogeochemical cycles of elements limiting primary production in the English Channel. I. Role of thermohaline stratification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146, 173–188.
- Millie, D.F., Schofield, O.M., Kirkpatrick, G.J., Johnsen, G., Tester, P.A., Vinyard, B.T., 1997. Detection of harmful algal blooms using photopigments and absorption signatures: a case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1240–1251.
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Claquin, P., 2013. Study of dynamics of phytoplankton and photosynthetic parameters using opportunity ships in the western English Channel. *J. Mar. Syst.* 128, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2013.04.019>.
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., Claquin, P., 2014. Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 505, 49–64. <https://doi.org/10.3354/meps10772>.
- Napoléon, C., Raimbault, V., Fiant, L., Riou, P., Lefebvre, S., Lampert, L., Claquin, P., 2012. Spatiotemporal dynamics of physicochemical and photosynthetic parameters in the central English Channel. *J. Sea Res.* 69, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.01.005>.
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaulot, D., Simon, N., 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4064–4072. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4064>.
- Pannard, A., Claquin, P., Klein, C., Le Roy, B., Véron, B., 2008. Short-term variability of the phytoplankton community in coastal ecosystem in response to physical and chemical conditions' changes. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 80, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.08.008>.
- Pearl, H.W., Valdes-Weaver, L.M., Joyner, A.R., Winkelmann, V., 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Pamlico sound system, North Carolina. *Ecol. Appl.* 17, 88–101.
- Peres-Neto, R., Legendre, P., Dray, S., Borcard, D., 2006. Variation Partitioning of Species Data Matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* 87 (10), 2614–2625. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2614:VPOSDM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2614:VPOSDM]2.0.CO;2).
- Perruche, C., Pondaven, P., Lapeyre, G., Rivière, P., Carton, X., 2011. Effects of surface quasi-geostrophic turbulence on phytoplankton and coexistence. *J. Mar. Res.* 69, 105–135. <https://doi.org/10.1357/002224011798147606>.
- Pingree, R.D., 1980. Physical oceanography of the Celtic sea and English channel. *Elsevier Oceanogr. Ser.* 24, 415–465. [https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(08\)71358-8](https://doi.org/10.1016/S0422-9894(08)71358-8).
- Pingree, R.D., Griffiths, D.K.G., 1978. Tidal fronts on the shelf seas around the British Isles marine biological association of the United Kingdom, Plymouth, England. *J. Geophys. Res. Ocean.* 83, 4615–4622. <https://doi.org/10.1029/JC083iC09p04615>.
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Head, R.N., 1977. Survival of dinoflagellates blooms in the western English Channel. *Nature* 265, 266–269. <https://doi.org/10.1038/266309a0>.
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Mardell, G.T., 1979. Phytoplankton growth and cyclonic eddies. *Nature* 278, 245–247.
- Pingree, R.D., Holligan, P.M., Mardell, G.T., 1978. The effects of vertical stability on phytoplankton distributions in the summer on the northwest European Shelf. *Deep-Sea Res.* 25, 1011–1028. [https://doi.org/10.1016/0146-6291\(78\)90584-2](https://doi.org/10.1016/0146-6291(78)90584-2).
- Pingree, R.D., Pugh, P.R., Holligan, P.M., Forster, G.R., 1975. Summer phytoplankton blooms and red tides along tidal fronts in the approaches to the English Channel. *Nature* 258, 672–677. <https://doi.org/10.1038/253600a0>.
- Pomati, F., Jokela, J., Simona, M., Veronesi, M., Ibelings, B.W., 2011. An automated platform for phytoplankton ecology and aquatic ecosystem monitoring. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9658–9665. <https://doi.org/10.1021/es201934n>.
- Pomati, F., Kraft, N.J.B., Posch, T., Eugster, B., Jokela, J., Ibelings, B.W., 2013. Individual cell based traits obtained by scanning flow-cytometry show selection by biotic and abiotic environmental factors during a phytoplankton Spring Bloom. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071677>.
- Pomati, F., Nizzetto, L., 2013. Assessing triclosan-induced ecological and trans-generational effects in natural phytoplankton communities: a trait-based field method. *Ecotoxicology* 22, 779–794. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1068-7>.
- Rantajarvi, E., Olsson, R., Hällfors, S., Leppänen, J.M., Raateoja, M., 1998. Effect of sampling frequency on detection of natural variability in phytoplankton: unattended high-frequency measurements on board ferries in the Baltic Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 697–704. <https://doi.org/10.1006/jmsc.1998.0384>.
- Rassoulzadegan, F., Laval-Peuto, M., Sheldon, R.W., 1988. Partitioning of the food ration of marine ciliates between pico- and nanoplankton. *Hydrobiologia* 159, 75–88. <https://doi.org/10.1007/BF00007369>.
- Reynolds, C.S., 2006. *Ecology of Phytoplankton* (Cambridge ed. Cambridge).
- Reynolds, C.S., 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 289, 9–21.
- Reynolds, C.S., 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Ribalet, F., Marchetti, A., Hubbard, K.A., Brown, K., Durkin, C.A., Morales, R., Robert, M., Swallow, J.E., Tortell, P.D., Armbrust, V.E., 2010. Unveiling a phytoplankton hotspot at a narrow boundary between coastal and offshore waters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16571–16576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005638107>.
- Richardson, T.L., Pincney, J.L., 2004. Monitoring of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* using gyroxanthin-based detection methods. *J. Appl. Phycol.* 16, 315–328. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047788.31312.4f>.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytom. Part A* 64, 16–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20106>.
- Salomon, J., Breton, M., 1993. An atlas of long-term currents in the Channel. *Oceanol. Acta* 16, 439–448.
- Schmitt, F.G., Seuront, L., 2008. Intermittent turbulence and copepod dynamics: increase in encounter rates through preferential concentration. *J. Mar. Syst.* 70, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.01.008>.
- Schubert, A., Telcs, A., 2014. A note on the Jaccardized Czekanowski similarity index. *Scientometrics* 98, 1397–1399. <https://doi.org/10.1007/s11192-013-1044-2>.
- Simpson, J.H., Nunes, R.A., 1981. The tidal intrusion front: an estuarine convergence zone. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 13. [https://doi.org/10.1016/S0302-3524\(81\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S0302-3524(81)80024-2).
- Smyth, T.J., Fishwick, J.R., Al-Moosawi, L., Cummings, D.G., Harris, C., Kitidis, V., Rees, A., Martinez-Vicente, V., Woodward, E.M.S., 2010. A broad spatio-temporal view of the Western English Channel observatory. *J. Plankton Res.* 32, 585–601. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp128>.
- Sournia, A., Birrien, J.L., Douvillé, J.L., Klein, B., Viollier, M., 1987. A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. I. The spring bloom within the annual cycle. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 25, 355–367. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(87\)90078-3](https://doi.org/10.1016/0272-7714(87)90078-3).
- Sultan, S.E., Spencer, H.G., 2002. Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *Am. Nat.* 160, 271–283.
- Tarran, G.A., Bruun, J.T., 2015. Nanoplankton and picoplankton in the Western English channel: abundance and seasonality from 2007–2013. *Prog. Oceanogr.* 137, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.poccean.2015.04.024>.
- Thorel, M., Claquin, P., Schapira, M., Le Gendre, R., Riou, P., Goux, D., Le Roy, B., Raimbault, V., Deton-Cabanillas, A.F., Bazin, P., Kientz-Bouchart, V., Fauchot, J., 2017. Nutrient ratios influence variability in *Pseudo-nitzschia* species diversity and particulate domoic acid production in the Bay of Seine (France). *Harmful Algae* 68, 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.jhal.2017.07.005>.
- Thyssen, M., Alvaïn, S., Lefebvre, A., Dessailly, D., Rijkeboer, M., Guiselin, N., Creach, V., 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, 4051–4066. <https://doi.org/10.5194/bg-12-4051-2015>.
- Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., Denis, M., 2008a. Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *J. Plankton Res.* 30, 1027–1040. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn054>.
- Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M.V., Holland, R.J., Grégori, G., Burkill, P.H., Denis, M., 2008b. The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *J. Plankton Res.* 30, 333–343. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn005>.
- Tilman, D., Kilham, S.S., Kilham, P., 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 13, 349–372.
- Travers-Trolet, M., Verin, Y., 2014. CAMANOC cruise, RV Thalassa. <https://doi.org/10.17600/14001900>.
- Van Leeuwen, S., Tett, P., Mills, D., van der Molen, J., 2015. Stratified and nonstratified areas in the North Sea: long-term variability and biological and policy implications. *J. Geophys. Res. Ocean.* 120, 4670–4686. <https://doi.org/10.1002/2014JC010485>. Received.
- Via, S., Lande, R., 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* (N. Y.) 39, 505–522. <https://doi.org/10.2307/2408649>.

- Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x>.
- Ward, J.H.J., 1963. Hierarchical grouping to optimize and objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>.
- Widdicombe, C.E., Eloire, D., Harbour, D., Harris, R.P., Somerfield, P.J., 2010. Long-term phytoplankton community dynamics in the Western English Channel. *J. Plankton Res.* 32, 643–655. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp127>.
- Winder, M., 2009. Photosynthetic picoplankton dynamics in Lake Tahoe: temporal and spatial niche partitioning among prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Plankton Res.* 31, 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp074>.



# Automated techniques to follow the spatial distribution of *Phaeocystis globosa* and diatom spring blooms in the English Channel and North Sea.

Arnaud Louchart<sup>1\*</sup>, Reinhoud de Blok<sup>2</sup>, Elisabeth Debuschere<sup>3</sup>, Fernando Gómez<sup>1</sup>, Alain Lefebvre<sup>4</sup>, Fabrice Lizon<sup>1</sup>, Jonas Mortelmans<sup>3</sup>, Machteld Rijkeboer<sup>5</sup>, Klaas Deneudt<sup>3</sup>, Arnold Veen<sup>5</sup>, Guillaume Wacquet<sup>1</sup>, François G. Schmitt<sup>1</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Lille, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, 62930 Wimereux, France;

<sup>2</sup> Laboratory of Protistology & Aquatic Ecology, Department of Biology, Ghent University, Ghent, Belgium;

<sup>3</sup> Flanders Marine Institute (VLIZ), Ostend, Belgium;

<sup>4</sup> IFREMER, LER/BL, Boulogne sur mer, France;

<sup>5</sup> Laboratory for Hydrobiological Analysis, Rijkswaterstaat (RWS), Zuiderwagenplein 2, 8224 AD Lelystad, The Netherlands;

\*corresponding authors: [arnaud.louchart@etu.univ-littoral.fr](mailto:arnaud.louchart@etu.univ-littoral.fr); [felipe.artigas@univ-littoral.fr](mailto:felipe.artigas@univ-littoral.fr)

## Abstract

Two innovative automated techniques were used to track phytoplankton spatial and temporal variability in the Eastern English Channel (EEC) and Southern North Sea, during three consecutive cruises in spring 2017, in the frame of local/national monitoring programmes in France, Belgium and the Netherlands. The cruises started after the onset of spring blooms in the EEC and followed their development along the EEC towards the southern North Sea, during one month. Our study aimed at: (i) applying multi-spectral fluorometry (MSF) and pulse shape-recording flow cytometry (PSFCM) to characterize *Pseudo-nitzschia* spp. and *Phaeocystis globosa*, which contribute to spring blooms in the area; (ii) highlighting the patchiness and sharp variability in abundance and chlorophyll a fluorescence (used as a proxy of biomass) of these species; (iii) studying the relation between nutrient loads and the extension of these potential HABs.

Both MSF and PSFCM revealed spatial heterogeneity in the distribution of phytoplankton groups. The MSF detected *Phaeocystis globosa* up to 80% of the total biomass in the French Region of Freshwater Influence (ROFI) named as the “Coastal flow”, the Dover Strait and the Dutch estuarine plumes whereas “brown Algae” (diatoms and dinoflagellates) represented always more than 60% of the total biomass in the Bay of Seine and the Thames estuary. PSFCM showed high abundance ( $7.0 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup>) of *P. globosa* life stages along the French coast, the Dutch coastal and estuarine waters, up to the Wadden Sea. *Pseudo-nitzschia* spp. were very abundant in the “coastal flow”, from the Bay of Somme to the Dover Strait and along the Dutch ROFI (under the direct influence of Westerschelde and Rhine estuaries), reaching up to  $3.0 \times 10^3$  cell mL<sup>-1</sup>. Validation of the results was carried out by microscopic observations and counts.

**Keywords:** Automated pulse shape-recording flow cytometry - Multispectral fluorometry - Harmful Algal Blooms - High Frequency phytoplankton monitoring - *Pseudo-nitzschia* spp. - *Phaeocystis globosa* - North Sea - Eastern English Channel

## Introduction

The Eastern English Channel (EEC) and the Southern North Sea (SNS) are influenced by Atlantic waters entering from the West into the English Channel. Several rivers bring freshwaters with nutrients inputs defining Regions of Freshwater Influence (ROFI) along the French, Belgian, U.K. and Dutch coastal systems. Some of these estuarine waters flow towards the North Sea (residual current) along the French coast resulting

in a brackish “coastal flow” (Brylinski et al., 1991). During spring, important nutrient loads together with the increase in irradiance are responsible of outbursts of phytoplankton species. In the EEC and SNS, spring blooms are characterized by diatoms and, in most locations, by *Phaeocystis globosa*. Thus, two potential HAB forming species were characterised in these areas: *Phaeocystis globosa* (foam-aggregates) and some species of the genus *Pseudo-nitzschia* (toxin producers). These areas

benefit of long-term monitoring at fixed stations coupled with seasonal cruises. Unfortunately, the techniques used are most of the time applied at low frequency (monthly or bi-monthly) and can miss occurrences and patches or extreme events.

For a decade, automated and innovative techniques including pulse shape-recording automated flow cytometry (PSFCM) and multi-spectral fluorometry (MSF) have allowed continuous recording/profiling in coastal and open sea systems as a complement of the existing monitoring in the area (*e.g.* Bonato et al., 2015; 2016). They lead to higher resolution (spatial and/or temporal) than those which can be achieved by applying reference techniques (*i.e.* microscopy, HPLC).

Automated techniques were applied to characterize HABs and monitor changes in abundance and biomass in phytoplankton communities. These automated approaches therefore represent a significant improvement for implementing the monitoring programme of the European Marine Strategy Framework Directive (MSFD).

## Material and Methods

### *Study area.*

Samples were collected during three cruises in spring 2017: April 21<sup>st</sup> to 30<sup>th</sup>, PHYCO-CNRS cruise on board the R/V “*Côtes de la Manche*”, May 4<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup>, LifeWatch-VLIZ-cruise on board the R/V “*Simon Stevin*” and May, 12<sup>th</sup> to 15<sup>th</sup>, RWS Spring cruise on board the R/V “*Zirfaea*”.

These cruises were planned in the frame of local programmes as the CPER MARCO French project, European projects JERICO-Next H2020 and LifeWatch as well as part of the Dutch national monitoring of coastal and marine waters and French national preliminary work for implementing the monitoring of pelagic habitats in the frame of the MSFD. According to phytoplankton observations from current monitoring within the partners involved, spring blooms start earlier in the EEC than in the SNS (Lancelot et al., 1987). Our sampling strategy followed the same chronology. Water was pumped continuously from approximately 3 m-depth and passed through an automated pulse shape-recording flow cytometer (PSFCM, CytoSense, CytoBuoy b.v.) to record and count particles every 10 min. Depending on the speed of the ship, we obtained a spatial resolution from 1.5 to 3.7 km. At 94 stations, water column was also investigated by reference measurements (pigments, nutrients),

multi-spectral fluorometry (MSF, FluoroProbe, bbe Moldaenke) profiles or discrete surface and bottom measurements, as for PSFCM.

### *Multispectral fluorometry (FluoroProbe, bbe Moldaenke).*

Because the water column is well-mixed, we focused on the sub-surface data. The MSF aims at discriminating spectral groups of algae based on their pigment's composition following the specific excitation spectrum (composed of 6 Leds) and corresponding emission of chlorophyll *a* fluorescence. Here, the FluoroProbe was set up to discriminate four spectral groups: “BlueGreen algae” (phycocyanin-containing cells such as Cyanobacteria), “Cryptophytes” (phycoerythrin-containing cells mainly Cyanobacteria and Cryptophytes), *Phaeocystis* (Haptophytes) and “Brown algae” (cells with fucoxanthin-derived pigments including diatoms and dinoflagellates). The *Phaeocystis* fingerprint was defined on cultures and during a massive bloom of the recorded in the EEC (Houliet et al., 2012).

### *Automated flow cytometry (CytoSense, CytoBuoy b.v.).*

The PSFCM characterize particles according to their optical signature from 1  $\mu\text{m}$  to 800  $\mu\text{m}$  (width) and a few mm (length). The intersection of the 5 $\mu\text{m}$  laser beam (488 nm) and each particle generate a pulse shape, itself composed of five signals according to the internal and/or external composition of the particles. The Forward Scatter (FWS) is associated with the size of the particle by calculating the length of this FWS. Size calibration was done using 3 and 10  $\mu\text{m}$  fluorescent beads. The Sideward Scatter (SWS) is related to internal and/or external component such as chloroplast, vacuole, nucleus or calcites plates. The signal is also composed of three types of fluorescence: Red as a proxy of chlorophyll *a*, Orange and Yellow for phycoerythrin and phycocyanin proxy. We set a low trigger level on the red fluorescence in order to separate photosynthetic-active seston and the detritus and non-living particulate matter. The discrimination of each group was processed taking into account the amplitude and the shape of the five signals. The discrimination between groups was processed manually with CytoClus® software (CytoBuoy b.v.). The software provides also several mathematical features on each signal (*e.g.* Length, Total, Average...) increasing the number of possible combinations.

## Results and Discussion

Deployments of the MSF showed high chlorophyll *a* concentration in the French brackish coastal waters (“coastal flow”), from the north of the Bay of Seine until the Dover Strait, the Dutch estuarine plumes and the Wadden Sea, where *Phaeocystis* represented more than 80% of the total biomass (Figure 1). At some places (*e.g.* French coast of the EEC, Dutch estuarine plumes), the *Phaeocystis* fingerprint could be considered as a quasi monospecific bloom formation (Anderson et al., 1998).

In the Thames and the Seine plumes, chlorophyll *a* estimated concentration was lower than in the “coastal flow”. Those estuarine influenced areas were characterized by Brown Algae (diatoms and dinoflagellates) representing always more than 60% of the total biomass (Figure 1) and the *Phaeocystis* proportion was higher in the Thames plume than the Bay of Seine.

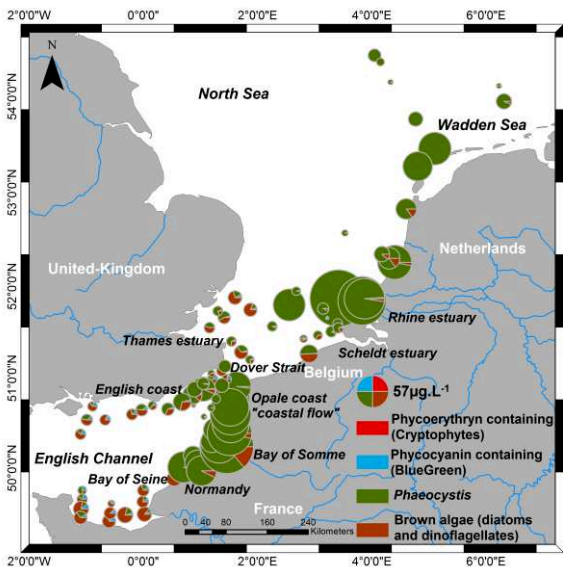


Figure 1: Spatial distribution of the 4 spectral groups identified by MSF during the spring 2017 cruises.

Up to seven groups were characterized by PSFCM during the three cruises (Table 1): two of those groups concerned potential HAB: *Phaeocystis globosa*-like, *Pseudo-nitzschia* spp.

Previous work enabled us to characterize the optical cytometric signature of *P. globosa* in the EEC/SNS during massive spring blooms (Rutten et al. 2005, Guiselin 2010, Bonato et al. 2016). As observed by Guiselin (2010), *P. globosa* can be subdivided into three groups, two haploid groups with a size around 3µm and two kinds of red fluorescence (low and high) and one diploid stage

with very high red fluorescence content and a size around 4-6µm. In our study, those three life stages were grouped together to form *P. globosa*-like group. All nanophytoplankton was defined as *Phaeocystis* in our study, even though other nanoeukaryotes were most probably present too.

Table 1: Cytometry groups discriminated by PSFCM and their estimated size (after calibration with beads).

Group	Size ± sd (µm)
<i>Synechococcus</i>	1.99 ± 0.45
Picoeukaryotes	3.01 ± 0.42
<i>Phaeocystis globosa</i> -like	5.40 ± 1.22
Cryptophytes	5.27 ± 2.47
Coccolithophores	7.06 ± 2.31
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	18.87 ± 4.78
Microphytoplankton	33.45 ± 10.25

In our study, a supplementary group was characterized, showing two symmetric chloroplasts based on the signature profile. This optical signature was compared with culture of *Pseudo-nitzschia* spp. shape file, which were similar to those collected during the cruise. Significant correlations were found between optical microscopy and PSFCM for *Pseudo-nitzschia* spp. ( $r = 0.39^{***}$  considering samples from PHYCO and RWS cruises and  $r = 0.77^{***}$  only for RWS cruise), *P. globosa* ( $r = 0.75^{***}$ ) and between *Phaeocystis* red fluorescence and *Phaeocystis* by CHEMTAX ( $\rho = 0.70^{***}$  for LifeWatch-VLIZ cruise). The spring blooms were clearly dominated, in terms of abundance, by nanophytoplankton groups, especially *P. globosa* (data not shown).

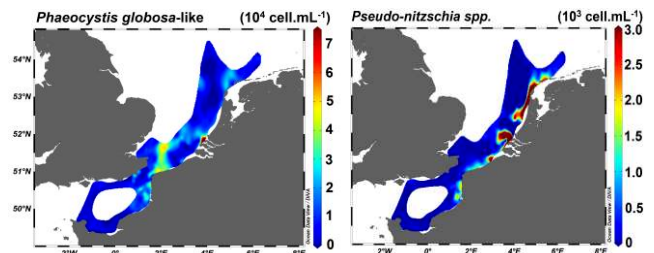


Figure 2: Spatial distribution of the potential HABs discriminated groups by the PSFCM during the spring 2017 cruises

High total abundance and biomass was evidenced along the French coast, starting from the Bay of Somme and then going towards offshore waters of the SNS, but also off along the Dutch estuaries and coast up to the Wadden Sea.

*P. globosa*-like was very abundant nearby the Rhine estuarine mouth. Abundance reached more

than  $7.0 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup> and the cells were mainly from the haploid stages. Along the French coast of the EEC, *P. globosa*-like reached  $4.0$  to  $5.0 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup>. Drifted by the residual current through the Strait of Dover we found the same range of abundance in offshore waters of the southern North Sea (Figure 2). Therefore, populations of the Rhine estuarine mouth and the French coast do not seem to be connected.

*Pseudo-nitzschia* spp. was very abundant in the French “coastal flow”, from the Bay of Somme to the Dover Strait and along the Dutch ROFI and coast (Figure 2). Abundance was higher along the Dutch coast than in the Strait of Dover. However, we found a succession of high and low abundance generating patchiness of abundance along the coast, from the Bay of Somme to Wadden Sea.

High Si:DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen) ratios were measured in the coastal area of the Rhine and Scheldt ROFI. Thus, silicate oversupplies the area and can be taken up by *Pseudo-nitzschia* spp. This suggests a potential limitation of nitrate for the development of *Phaeocystis globosa*.

Along the French coast, the Bay of Seine and Normandy coasts were characterized by a high Si:P ratio whereas at the Opale coast (“coastal flow”), phosphorus was limited over DIN (High DIN:P). High Si:P is suitable for diatoms development whereas the potential phosphorus limitation in the French EEC favors a bloom of colonial *P. globosa* form (Veldhuis and Admiraal, 1987).

In summary, innovative techniques successfully characterized *Pseudo-nitzschia* genus and/or *P. globosa* outbursts, which contribute greatly to the spring blooms in the EEC-SNS area. They were able to highlight patchiness and sharp variations in abundance and fluorescence of potential HABs. A major improvement will focus in the future on the automated identification of more HABs taxa. Identifying optical signatures can lead to a better and/or an automated characterization of particles by semi-supervised classification based on PSFCM features and optical profiles (R package « RclusTool<sup>1</sup> » Wacquet *et al.*, this volume). Thus, coupling those tools and implementing automated techniques (*e.g.* PSFCM improved with automated image acquisition and MSF) during cruises on Research Vessels, ships of opportunity and/or automated moorings or fixed platforms could increase the detection of HABs and better

understand the fine spatial and temporal dynamics (JERICO-NEXT project). By increasing the sampling frequency, automated techniques would represent early warning systems of HAB blooms for environmental management.

### Acknowledgements

Arnaud Louchart benefits of a PhD grant from the French government (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche/ Université du Littoral-Côte d'Opale) and the French Region Hauts-de-France. The cruise and lab work were funded by the JERICO-NEXT project, the European Union (ERDF), the Flemish contribution to the LifeWatch ESFRI by Flanders Marine Institute, the French Government, the French Region Hauts-de-France and Ifremer, in the framework of the project CPER MARCO 2015-2020 and the French Ministry for the Ecological and Inclusive Transition in the frame of its convention with CNRS (n°2101893310) for the implementation of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD). We thank the Captains and the crews on board the R/V « Côtes de la Manche », « Simon Stevin » and « Zirfaea » as well as of scientific and technical staffs of RWS, VLIZ and CNRS-LOG.

### References

- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (1998). Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Springer.
- Bonato S, Christaki U, Lefebvre A, Lizon F, Thyssen M, Artigas LF (2015). Estuarine, Coastal and Shelf Science. 154:214-223
- Bonato S, Breton E, Didry M, Lizon F, Cornille V, Lécuyer E, Christaki U, Artigas LF (2016). Journal of Marine Systems. 156:76–85
- Brylinski JM (1991). Oceanology Acta. 11:197-203
- Guiselin N (2010). Ph.D. Thesis. Université du Littoral-Côte d'Opale. 237pp
- Houliez E, Lizon F, Thyssen M, Artigas LF, Schmitt FG (2012). Journal of Plankton Research 34:136–151
- Lancelot C, Billen G, Sournia A, Weisse T, Colijn F, Veldhuis MJW, Davies A, Wassman P. (1987) Ambio 1:38-46
- Rutten TPA, Sandee B, Hofman ART (2005). Cytometry Part A 64:16–26
- Veldhuis MJW, and Admiraal W (1987). Marine Biology 95:47-54

<sup>1</sup> <http://mawenzi.univ-littoral.fr/RclusTool/>



# Combination of machine learning methodologies and imaging-in-flow systems for the automated detection of Harmful Algae

Guillaume Wacquet<sup>1,2,3,\*</sup>, Alain Lefebvre<sup>2</sup>, Camille Blondel<sup>2</sup>, Arnaud Louchart<sup>1</sup>, Philippe Grosjean<sup>3</sup>, Nadine Neaud-Masson<sup>4</sup>, Catherine Belin<sup>4</sup>, Luis Felipe Artigas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Oceanology and Geosciences (UMR 8187 LOG), CNRS, ULCO, ULille, Wimereux, France

<sup>2</sup> Ifremer, Environment and Resources Laboratory (LER), Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup> Univ. Mons, Complexys Institute, Laboratory of Numerical Ecology of Aquatic Systems, Mons, Belgium

<sup>4</sup> Ifremer, Information System for Integrated Management and Monitoring (VIGIES), Nantes, France

\* Corresponding authors: [guillaume.wacquet@univ-littoral.fr](mailto:guillaume.wacquet@univ-littoral.fr); [felipe.artigas@univ-littoral.fr](mailto:felipe.artigas@univ-littoral.fr)

## Abstract

In recent years, improvements in data acquisition techniques have been carried out to sample, characterize and quantify phytoplankton communities at high temporal and geographical resolution, with a special focus on potential harmful algae, during oceanographic campaigns or in the frame of monitoring networks (to support knowledge but also for EU Directives and Regional Sea Convention needs). These acquisition and digitization techniques, including "imaging-in-flow" systems, allow to process a high number of samples and, consequently, generate an important quantity of data in which the presence of target events might not be detected. Indeed, as for traditional samples analysis with inverted microscope, a full manual quantification of the particles based on a simple visual inspection can be time-consuming, tedious and consequently lead to erroneous or wrong identifications.

For this purpose, the ZooImage R-package was and is still being developed to allow greater automation in data classification and analysis while also permitting some user-interaction during the process. The proposed methodology consists in combining few expert knowledge and machine learning algorithms at different levels: (i) to classify particles into different groups based on the definition and the adaptation of a specific training set through the use of "contextual data"; (ii) to detect and partially validate the "most suspect" predictions, based on a probability of misclassification; (iii) to estimate the number of cells for each colonial form thanks to the building of specific predictive models.

These different semi-automated tools were applied to the *in vivo* image dataset acquired with the FlowCam instrument during the September-October CAMANOC 2014 (Ifremer) cruise in the English Channel, in order to evaluate their operational ability to monitor the diversity of samples for the microphytoplankton, and especially to detect, track and count the most frequent potentially harmful algae found in this area at that period, like species belonging to *Pseudo-nitzschia*, *Dinophysis*, *Prorocentrum* and *Phaeocystis* genera. A distribution of these target groups was computed which highlights different sub-regions in the English Channel during the late summer-fall transition.

**Keywords:** Machine learning; User-interaction; Semi-automated classification; English Channel; HABs.

## Introduction

Since 2000, phytoplankton is defined as a biological parameter for marine quality assessment by the Water Framework Directive (WFD) and in 2008, the European Marine Strategy Framework Directive (MSFD) confirms this capacity. Today, about 7000 different species have been identified worldwide of which about 70 are potentially harmful (toxins or foam producers). Because of the consequences they have on the ecosystems goods and services, their economic and health impacts, the occurrence of these toxic events contributed to renewed interest towards studies on marine ecosystem, including ecological, climatic and economic domains.

The traditional technique to determine the phytoplankton composition of a sea water sample, is the identification and enumeration by inverted microscopy method after sedimentation (Utermöhl, 1958). However, this method is time consuming and requires experts specialized in phytoplankton taxonomy. Moreover, it cannot detect spatial and temporal changes in the marine ecosystem combining high frequency and quality of information obtained without competent human participation to collect and classify these samples. Recent advances in image analysis and pattern recognition have made possible to estimate microphytoplankton concentration without hard numerical process, directly on living samples

(Tang *et al.*, 1998). These approaches, using digital imaging of phytoplankton particles measured by image analysis and classified using machine learning algorithms, reduce the analysis time, improve the counting accuracy and can carry out a lot of measurement providing opportunities for microbiologists to get new insights into the functioning of communities in the nano-microplankton size range (Benfield *et al.*, 2007).

Over the past few decades, different specialized systems coupling digitization devices and data processing software have been developed for enumeration and measurements of particles in the nano-microplankton size range, like the Imaging FlowCytoBot instrument (IFCB) coupled to a specific data processing and classification software (Olson and Sosik, 2007), or the FlowCam® system (Fluid Imaging Technologies, Inc.<sup>1</sup>) associated to the VisualSpreadSheet® software (Sieracki *et al.*, 1998). Unfortunately, these software systems are designed for specific devices and are not always compatible with other imaging systems. Additionally, recent optimization of plankton imagers leads to faster digitization, multiplication of analyses and accumulation of a large quantity of data and images.

In this context, we propose to develop, to test and to prove the added-value of a semi-automated identification system for phytoplankton classification. This system could improve our knowledge of the ecology of phytoplankton by allowing semi-automated analyses to be applied to a higher temporal/spatial resolution than traditional techniques, due to time saving during data acquisition and processing steps (including validation of the results). These analyses are thus better adapted to study the frequencies of phenomena that control this biological compartment (Cloern, 1996). The proposed tool consists in coupling the FlowCam device for acquiring the digital images of phytoplankton particles in a sample, with the ZooImage R-package<sup>2</sup>, which allows identifying and counting phytoplankton in a semi-automated way (Grosjean and Denis, 2013).

## Material and Methods

### *Sampling strategy*

The CAMANOC cruise was a multidisciplinary survey within the framework of an ecosystem approach to fisheries. It was conducted from

September 16 to October 12, 2014, in the Western and Central English Channel, on-board the R/V “Thalassa” (IFREMER). Water samples were collected at 89 sampling stations at subsurface (<0.5m), using a 5-L Niskin bottle. These samples were maintained cold (4°C) and in the dark until their analysis.

### *Imaging-in-flow system*

Samples were digitized using an 8-bit grayscale benchtop FlowCam® VS with the pump speed set to 1.8 ml.min<sup>-1</sup>. A 4X objective (40X overall magnification) coupled with a 300µm-depth flow-cell was used and samples were run in “AutoImage” operation mode. As described by Zarauz *et al.* (2007), all particles in the field of view of the camera (phytoplankton, zooplankton and inorganic particles) are imaged and captured at a regular user-defined interval, which allows an accurate estimation of imaged volume and consequently of particle concentration.

The specific software program, provided with the FlowCam device and named VisualSpreadSheet, is essential for all the major aspects of analysis: setup for data acquisition through the context settings for controlling the device, managing files and setting preferences, data acquisition and post-processing of collected data. For each particle, we obtain a set of 26 image parameters: 8 basic shape parameters (area, length, width, etc.), 13 advanced morphological parameters (circularity, convexity, roughness, etc.) and 5 grayscale measurements (intensity, transparency, etc.). The rest of the process, from image processing to statistical analysis, is done using the version 5.5.2 of the ZooImage R-package.

### *Training set and classifier*

Building a training set is a crucial step in the automated recognition of plankton. Indeed, it represents the database used to generate a tool for automated or semi-automated recognition. Within this study, a training set representative of each plankton community met in the English Channel, was built using samples taken throughout 2013 (in the frame of the Ifremer Regional Nutrients Monitoring network) and 2014 (in the frame of the CNRS LOG DYPHYRAD monitoring transect). A total of 3582 images were manually classified in 28 plankton groups. Moreover, instead of manually removing detrital particles and artefacts as is commonly done (Zarauz *et al.*, 2007), we added 12

<sup>1</sup> <https://www.fluidimaging.com/>

<sup>2</sup> <https://cran.r-project.org/web/packages/zooimage/>

groups for floating dark and light dead particles, bubbles, fibers, etc. to the 28 plankton groups in order to automatically identify and then eliminate them from the statistics. Finally, 5154 images were sorted into 40 groups. From this training set, a classifier is trained using the “Random Forest” algorithm (Breiman, 2001). Global error measured by using 10-folds cross-validation is equal to 25% for this training set.

#### *Adaptive learning*

Phytoplankton communities are sensitive to environmental and climate changes and modifications in their composition can occur at fast rates, which can lead to significant prediction errors when a static training set is used. Indeed, the representativeness and the variability of the particles into each group in the training set can have an important impact on the classification results. However, in order to build an ideal training set, a large number of labelled particles is needed, but also requires a lot of time, human resources and skills. To overcome this problem, adaptive learning improves a simple training set by adding labelled items taken from a pool of candidates.

This pool is composed of particles belonging to samples taken in the same experimental conditions than the studied one, and already validated by an expert. These “contextual” data allow to adapt the training set temporally and geographically to the phytoplankton communities generally encountered in the studied area and consequently to reduce the initial prediction error by 20-30%. In this study, one sample was selected every 2 days and all particles were manually labelled and validated. These particles were added to the initial training set in order to build an adapted recognition tool which is then used to classify the samples of the next 2 days.

#### *Semi-automated validation*

Performance scores obtained by completely automated classification are often considered too low to provide relevant abundances for all groups. Therefore, it is necessary to validate these predictions (Gorsky *et al.*, 2010). However, the validation of all predictions can be tedious and time-consuming if the sample size is important. In the ZooImage package, sophisticated techniques for semi-automated recognition are proposed. This allows a less biased estimation of abundance without having to manually validate all images. In this context, the images which must be validated are detected by the automated classification system

on the basis of a probability of a correct prediction for each particle. Once the images validated, the error can be modelled in order to perform statistical corrections. This approach offers an ideal trade-off between the full-automated method and the total manual validation while guaranteeing similar or better performances of recognition within an acceptable time. Moreover, the statistical correction of the remaining errors associated to the adaptive learning method, allows decreasing the global error more rapidly than with the initial training set.

#### *Single cell counts*

Usually, with automated acquisition systems like FlowCam, IFCB, flow cytometry, etc., colonies are considered and subsequently counted as one single particle, the same as single cells. Moreover, although colonies contribute largely to annual productivity, all biomass estimators are essentially calibrated on abundance in terms of single cells per volume unit. That is why the automated counting of the number of single cells in the various colonial forms represents a real challenge.

The proposed method consists in building specific predictive models for each studied group, based on the manual counts made on images contained in the training set. For this, a multivariate analysis was performed thanks to a simple linear modelling.

## **Results and Discussion**

#### *HABs distribution in the English Channel*

An important spatial heterogeneity in microphytoplankton distribution was observed all along the sampling area. In order to highlight specific areas for the potential HABs and the associated spatial distribution, a clustering method was applied to their abundances. The Partitioning Around Medoids algorithm (PAM) showed 3 distinct areas (Figure 1):

- Western English Channel (WEC) where HABs were essentially characterized by *Pseudo-nitzschia* genus;
- Central English Channel (CEC) with high abundances of dinoflagellates (*Prorocentrum* genus) and haptophytes (*Phaeocystis* genus);
- Bay of Seine (BOS) where the highest abundances of *Pseudo-nitzschia* and *Prorocentrum* genera were observed.

#### *Microscopy comparison and single cell counts*

In order to validate these results, a comparison with the abundances obtained by microscopic counts

was performed in some stations in the WEC, and especially for the most abundant genus which is *Pseudo-nitzschia*. As shown on Figure 2, the raw abundance (*i.e.* with colonial forms) estimates obtained with the FlowCam were always lower than counted with the inverted microscope, for which all cells were counted, whether they be in a colonial or a single cell form.

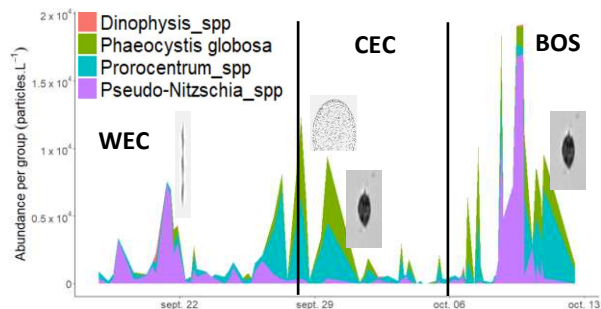


Fig. 1. Variability of the abundances (particles.L<sup>-1</sup>) of each harmful genera during the CAMANOC cruise.

However, despite this under-estimation, a significant Spearman's rank correlation coefficient was found between *Pseudo-nitzschia* FlowCam and microscopic counts (Table 1).

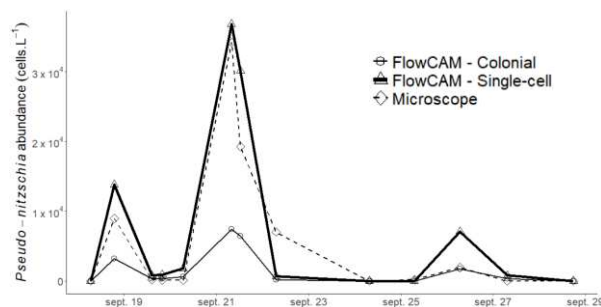


Fig. 2. Comparison between cell abundance obtained by microscopy (dashed line) and FlowCam with (○) and without single cell enumeration for *Pseudo-nitzschia* genus in some stations in WEC.

After application of the specific predictive model for *Pseudo-nitzschia*, the overall dynamics of abundance obtained by microscopy and FlowCam were similar (Figure 2). In addition, an increase of the correlation coefficient was observed.

The results presented in this study highlight the need and the relevance of the combination of the automated process and the integration of some expert knowledge. However, in order to lead to more accurate discrimination, an optimization of training sets and algorithms, associated with the improvement of the resolution of the digital images, is still needed. Moreover, it is important to note that the ZooImage package, and consequently

all the (semi-)automated tools presented in this study, can also be used on images acquired by various automated systems, like ZooScan, IFCB, etc.

Table 1. Spearman's rank correlation coefficient between *Pseudo-nitzschia* abundances obtained by microscopy and by FlowCam analysis, considering colonial forms or single cells counting.

Comparison	Spearman	p-value
Colonial form	0.74	< 0.05
Single cell	0.79	< 0.05

### Acknowledgements

The authors thank the P.I. of the CAMANOC cruise (Morgane Travers-Trollet), as well as the captain and crew of R/V "Thalassa". Guillaume Wacquet was supported by post-doctoral grants funded by the Complexys Institute of the University of Mons and by the "Conseil Régional des Hauts-de-France" and is currently supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) in the frame of the MSFD convention (n°2101893310) with the French Ministry for an Ecological and Inclusive Transition (MTES), for the monitoring programme for pelagic habitats.

### References

- Benfield M. C., Grosjean Ph., Culverhouse P. F., Irigoien X., Sieracki M. E., Lopez-Urrutia A., Dam H. G., Hu Q., Davis C. S., Hansen A., Pilskaln C. H., Riseman E. M., Schultz H., Gorsky G. (2007). *Oceanography* **20**, 172-187.
- Breiman, L. B. (2001). *Mach. Learn* **45**, 5-32.
- Cloern, J.E. (1996). *Geophysics* **34(2)**, 127-168.
- Gorsky G., Ohman M.D., Picheral M., Gasparini S., Stemmann L., Romagnan J.-B., Cawood A., Pesant S., García-Comas C., Prejger F. (2010). *Plankton Research* **32(3)**, 285-303.
- Grosjean Ph., Denis K. (2013). *Data Mining Applications with R*, Elsevier, 978-0-12-411511-8, Chapter 12.
- Olson R.J., Sosik H.M. (2007). *Limnol. Oceanogr.* **5**, 195-203.
- Sieracki C. K., Sieracki M. E., Yentsch C. S. (1998). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **168**, 285-296.
- Tang X., Stewart W. K., Vincent L. U. C., Huang H. E., Marra M., Gallager S. M., Davis C. S. (1998). *Artificial Intelligence Review* **12**, 177-199.
- Utermöhl H. (1958). *Mitt. Int. Ver. Limnol.* **9**, 1-38.
- Zarauz L., Irigoien X., Urtizberea A., Gonzalez M. (2007). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **345**, 27-39.



## Résumé en français

Au sein des écosystèmes côtiers, la composition, la distribution et la dynamique phytoplanctoniques sont influencées par les variations spatio-temporelles des structures hydrologiques et des paramètres biogéochimiques, sous les pressions naturelles et anthropiques. Les suivis de référence, de par leur faible résolution spatiale et temporelle, peuvent manquer des événements-clés comme l'initiation ou la fin des efflorescences ou nuisibles (du type Harmful Algal Blooms). Pour permettre leur détection et mieux comprendre la distribution et la dynamique de ce compartiment à la base des réseaux trophiques et acteur majeur des cycles biogéochimiques, l'utilisation d'approches automatisées à haute fréquence permet de compléter les approches taxinomiques par la caractérisation fonctionnelle de l'ensemble du spectre de taille du phytoplancton. Cette thèse est consacrée à l'étude des caractéristiques morphologiques et physiologiques des groupes fonctionnels phytoplanctoniques définis à partir de leurs propriétés optiques à l'échelle de l'individu, rencontrés dans des mers épi-et intracontinentales contrastées en utilisant la cytométrie en flux automatisée de type « pulse-shape-recording ». Tout d'abord, la distribution des groupes phytoplanctoniques et de leurs traits ont été explorés en Manche occidentale et centrale lors de la transition été-automne, ce qui a permis de mettre en évidence la formation de patches d'abondance et de biomasse à proximité du front d'Ouessant et une structuration à sub-mésoséchelle. En deuxième lieu, la dynamique des groupes fonctionnels phytoplanctoniques en Manche orientale et sud Mer du Nord a été étudiée pendant la période de développement des blooms printaniers de diatomées et de *Phaeocystis globosa*, avec l'utilisation de la LCBD et de la SCBD permettant l'observation de ségrégation spatiale entre groupes phytoplanctoniques dont leur distribution est expliquée par les paramètres de niche (marginalité et tolérance). Enfin, l'étude des paramètres conditionnant la distribution spatiale verticale le long d'un gradient de salinité en Mer Baltique a été abordée pendant la période estivale, en relation avec les propriétés biogéochimiques des masses d'eaux, qui a permis d'identifier les caractéristiques des groupes phytoplanctoniques participant à la distribution des groupes phytoplanctoniques. Les variations des traits ressortent comme étant les meilleurs prédicteurs de la distribution horizontale et verticale vis-à-vis des paramètres de niche et des descripteurs spatiaux (dispersion, paramètres physiques et biologiques). L'approche par traits fonctionnels, dérivés des mesures optiques à haute résolution, couplée à l'analyse de niche permettent d'avancer dans la compréhension des réponses des communautés aux gradients environnementaux, elles-mêmes détectées par les mesures d'indices de diversité. Ce travail a bénéficié de l'appui des projets régionaux (CPER MARCO), nationaux (convention MTES-CNRS) et européens (JERICO-NEXT).

## Résumé en anglais

In coastal ecosystems, phytoplankton composition, distribution and dynamics are strongly influenced by spatial and temporal variations of hydrological structures and biogeochemical parameters, consequences of natural and anthropogenic pressures. Reference monitoring, due to its low spatial and temporal resolution, may fail to detect key events as the initiation and end of phytoplankton outbursts or harmful algal blooms (HABs). By increasing the spatial and/or temporal resolution as well as completing taxonomical counting by investigating the phytoplankton whole size spectra, the use of automated sensors may allow contributing to a better understanding of the distribution and dynamics of this major player in biogeochemical cycles, at the basis of most food webs. This thesis consists in studying the characteristics of phytoplankton functional groups defined from their optical properties at the single-cell level, in relation to spatio-temporal variability encountered in contrasting marginal seas, applying the pulse shape-recording automated flow cytometry. This functional classification reflects the diversity of particles according to morphological and physiological properties. First of all, the distribution of phytoplankton groups and their traits were explored in the Western and Central English Channel during the summer period. Most groups formed patches of abundance and biomass near the Ushant front and were structured at the sub-mesoscale. Secondly, phytoplankton functional groups dynamics was characterized in the Eastern English Channel and Southern North Sea during the development period of diatoms and *Phaeocystis globosa* spring groups, by calculating LCBD and SCBD, which allowed the observation of spatial segregation between phytoplankton groups. Their distribution was explained by the niche parameters (marginality and tolerance). Finally, the vertical distribution of phytoplankton functional groups in a salinity gradient was addressed in the Baltic Sea, in relation to the biogeochemical properties of the water masses and the characteristics of each PFGs. The variations of the traits are thus stand out as the best predictors of the horizontal and vertical distribution of phytoplankton groups with respect to niche parameters and spatial descriptors (dispersion, physical and biological parameters). The functional approach, derived from phytoplankton optical properties addressed by automated flow cytometry, coupled to the niche analysis, make it possible to better explain and predict community responses to environmental gradients, such responses being detected in parallel by diversity indices. This work benefited from the support of local (MARCO State-Region Plan Contract), national (CNRS-MTES convention) and international European H2020 JERICO-NEXT projects.