



Production primaire et dynamique phytoplanctonique le long d'un gradient d'eutrophisation : Continuum estuaire-baie de Seine

Leon Serre-Fredj

► To cite this version:

Leon Serre-Fredj. Production primaire et dynamique phytoplanctonique le long d'un gradient d'eutrophisation : Continuum estuaire-baie de Seine. Ecosystèmes. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC234 . tel-03858334

HAL Id: tel-03858334

<https://theses.hal.science/tel-03858334>

Submitted on 17 Nov 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

**Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS -
INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Production primaire et dynamique phytoplanctonique le long d'un
gradient d'eutrophisation : Continuum estuaire-baie de Seine**

**Présentée et soutenue par
LEON SERRE-SERRE-FREDJ**

**Thèse soutenue le 23/06/2022
devant le jury composé de**

MME SOPHIE RABOUILLE	Chercheur HDR, Sorbonne Université	Rapporteur du jury
M. FORSTER RODNEY	Maître de conférences HDR, Université de Hull	Rapporteur du jury
M. LUIS FELIPE ARTIGAS	Maître de conférences, UNIVERSITE LITTORAL COTE D'OPALE	Membre du jury
M. MYRIAM BORMANS	Directeur de recherche, UNIVERSITE RENNES 1	Membre du jury
MME TANIA HERNANDEZ	Chercheur, IFREMER	Membre du jury
M. JEAN-MARC LEBEL	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Président du jury
M. PASCAL CLAQUIN	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par PASCAL CLAQUIN (Biologie des organismes et écosystèmes
aquatiques (Caen))**

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative Santé et Environnement (EdN BISE 497) dans le laboratoire BOREA - Biologie des Organismes & Ecosystèmes Aquatiques - UMR CNRS-8067, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD-207, Sorbonne Université, UA, UniCaen

Cette thèse s'inscrit dans les programmes de recherche SARTRE (GIP SA), PHRESQUES (GIP SA) et SMILE² (AESN). Cette thèse a été co-financée par la Région Normandie et l'Agence de l'eau Seine Normandie.
Les travaux en lien avec la bouée SMILE ont été réalisés en collaboration étroite avec IFREMER (LERN-Port en Bessin et RDT-LDCM-Brest)



« *It would be well, at the beginning of this symposium to try to find out exactly what we
are about to discuss.* »

Hutchinson lors du premier symposium international sur l'eutrophisation (1969)
rapporté par Nixon (1995)

Remerciements

Pour commencer je tiens à remercier tout particulièrement Pascal Claquin, mon directeur de thèse. Merci pour cette plongée dans le milieu fascinant du phytoplancton et de la photosynthèse. Merci pour tous les précieux conseils, la connaissance mais aussi pour le soutien que tu as su m'apporter tout au long de ces trois années. Merci aussi pour les missions, les discussions, les plaisanteries et la liberté accordée dans mon travail et mes expériences. J'essayerai de répandre la bonne parole sur la fluorimétrie variable !

Merci aussi à Sophie Rabouille et Rodney Forster d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Mais aussi à Myriam Bormans, Tania Hernandez, Felipe Artigas et Jean-Marc Lebel d'être mes examinateurs.

Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse : Muriel Bardor, Philippe Pondaven, Tania Hernandez et Victor Maignan qui m'ont suivi et conseillés durant ma thèse.

Merci à Karim Nouioua et Jean-Luc Mari directeurs du M2 CCI qui m'ont facilité l'accès et la transition à la thèse en même temps que mon master, en plus de tout ce qu'ils ont pu m'apprendre sur l'informatique.

Travaillant à la station du CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) de Luc-sur-mer depuis plus de trois ans, c'est toute l'équipe sur place qui m'a toujours soutenu tout au long de ma thèse, je veux donc aussi les remercier chaleureusement :

Léo, mon binôme durant la thèse, est le tech' le plus motivé de France, merci pour tout, pour les discussions méthodologiques, scientifiques mais aussi celles autour des BD ou autres. Merci surtout pour ton efficacité au travail, cela aurait été plus complexe sans le travail que tu as abattu continue de faire preuve de rigueur et de «délicatesse». Promis on va rouler

Maxime, pour son florilège de plaisanteries qui ne doivent pas sortir de l'enceinte du bureau, mais aussi pour tous ses conseils sur R et sur les méthodes mathématiques, sur les autres logiciels ainsi que tous les autres coups de main que tu as pu me donner. Enfin cela me fait plaisir que me faire plaisir te fasse plaisir.

Orianne, qui m'a passé un nombre incalculable d'échantillons malgré les sabotages successifs de la machine, qui est restée calme malgré notre tendance au chaos dans le labo et qui est aussi la raison pour laquelle je n'ai pas fini à l'eau durant la thèse. Merci aussi d'être la seule présence paisible du bureau.

Guillaume, qui a apporté un soutien technique important et qui, malgré sa capacité à râler en toute situation, a toujours trouvé des solutions à tous les problèmes en un temps record. Merci aussi pour les discussions, pour ce que tu as pu m'apprendre et évidemment pour l'encadrement du stage.

Baptiste, l'autre doctorant du bureau qui m'a évité beaucoup d'inconvénients tout au long de la thèse, merci pour les coups de main, pour les discussions, les conseils. Bonne chance pour la reconquête du Duché de Hauteville.

Maël, arrivé tardivement mais qui a contribué activement à rendre le bureau plus vivant (littéralement comme au sens figuré) et ainsi augmenter la biodiversité locale. Jérôme, Thomas et Valentin qui ont fréquenté le bureau pendant un temps : merci aussi pour les discussions, les missions et ce que vous avez pu m'apprendre. Merci aussi aux autres membres de l'atelier : David Lemeille, notre capitaine attitré, Jean-Paul Lehodey, l'homme capable de tout faire, Frédéric Guyon, le plus grand pêcheur de la côte de Nacre, David Liegard qui s'assurait souvent que je n'avais pas rendu l'âme.

Bien que nettement inférieur à celui du Sud, je tiens à remercier aussi les membres du CREC Nord parmi eux mes seichologues favoris : Manon, François, et Lisa ainsi que les membres du GEMEL : Oliver le maître des jeux, Andréa, Elodie et Erwan. Merci pour toutes ces soirées et tous ces jeux sans fins !

L'Ifremer n'était pas bien loin : merci au vieux briscard Franck Jacqueline pour son soutien technique et pratique durant les campagnes en baie, notamment sur la bouée et pour l'intérêt porté à mon travail. Merci à Angeline Lefran, la doctorante cachée, pour les discussions, pour les connaissances apportées, pour m'avoir adapté à son groupe lors de l'EVOLECO (ce fut « intéressant »- cf Thibault).

Merci aux marins des deux équipages du "Côtes de la Manche" ainsi qu'à David le Ber et Romaric Verney pour les missions en baie de Seine.

Merci à l'équipage de l'Aillot, du "Ville de Paris", ainsi qu'à Michel et Romain du

M2C Rouen pour les missions sur l'estuaire de la Seine.

Merci aux stagiaires qui ont tous contribué un peu à ma thèse et à la bonne dynamique du laboratoire : Clémence Blais, Pauline Delalain, Marie Fourrage, Carla Larvor, Juliette Croenne, Océane Fere et Alexis Pecret.

D'autres ont contribué à ma thèse via l'apport de données, des échanges scientifiques ou bien des conseils. À ce titre, je remercie François Gohin, Jean Philippe Lemoine, Cédric Fisson, Olivier Cantat et Julien De Bortoli.

Merci à la société FredjTM pour la correction du manuscrit.

Enfin merci à tous mes amis : Raph' (promis je viens jouer), Kyron (une partie?), ainsi qu'au groupe dit "du coin" : Victor, Kieffer, Sacha, Benoit, Kevin, Alex, Etienne, Caro et Amaury, j'aurais plus de temps pour vous tous maintenant !

Je remercie aussi toute ma famille, à commencer par ma fratrie avec mon frère qui diffuse le sujet de l'eutrophisation au sein des écoles d'ingénieurs et ma sœur qui en pré-nomme son chat. Mes deux tantes, toutes les deux intéressées par mon sujet, merci Tidou pour les corrections et Anne-Isabelle d'être passée ! Merci à mes grands-parents qui sont sûrement responsables de ma passion pour la mer d'un côté et de la Normandie de l'autre.

Enfin j'aimerais remercier ma mère qui m'a toujours soutenu dans ce projet durant tout ces années et à raison puisqu'on y est !

Glossaire

- α : Efficacité photosynthétique
- σ_{PSII} : Section d'absorption fonctionnelle du PSII (nm^2)
- β : Photoinhibition
- $\Phi_{e,c}$: Nombre de moles d'électrons requis pour fixer une mole de carbone ($\text{mol électron.mol carbone}^{-1}$)
- a^* : Section d'absorption fonctionnelle de la chl a (m^{-1})
- a_{LHII} : Coefficient d'absorption du PSII (m^{-1})
- APA : Activité de la Phosphatase Alcaline
- BEF : *Biodiversity-Ecosystem Function*
- Chl a : Chlorophylle a
- E : Irradiance (*photons flux density*) ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- E_k : Intensité de saturation lumineuse ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- $\text{ETR}_{II(max)}$: Taux absolu (maximum) de transport des électrons du PSII par unité de volume et de biomasse ($\text{mmol e}^{-}.\text{m}^{-3}.\text{h}^{-1}.\mu\text{g chl } a^{-1}$)
- FRRf : *Fast Repetition Rate fluorimeter*
- F_m : Fluorescence maximale après acclimatation à l'obscurité
- F_o : Fluorescence minimale après acclimatation à l'obscurité
- F : Fluorescence
- F_v/F_m : Rendement quantique maximal du PSII
- F'_q/F'_m : Rendement quantique effectif pour une irradiance donnée
- H' : Indice de diversité de Shannon-Wiener
- J' : Indice d'équitabilité de Pielou
- JV_{II} : Flux photochimique du PSII par unité de volume ($\text{mmol e}^{-}.\text{m}^{-3}.\text{h}^{-1}$)
- NPQ : extinction non-photochimique (*Non-Photochemical Quenching*)
- P^c : Production primaire en unité de carbone
- PAM : *Pulse Amplitude Modulated (fluorimeter)*
- PAR : Radiation photosynthétique active (*Photosynthetic Active Radiation*)
- PPP : Production Primaire Phytoplanctonique ($\text{g C.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$)
- PTA : Analyse Triadique Partielle
- PSI, PSII : Photosystèmes I et II
- $\text{rETR}_{II(max)}$: Taux relatif (maximum) de transport des électrons du PSII ($\text{mmol e}^{-}.\text{m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)
- RUE : Efficacité d'utilisation de la ressource (*Resource Use Efficiency*)
- STAF : *Single Turnover Active Fluorimetry*
- TEP : Particules transparentes exopolymériques (*Transparent Exopolymeric Particle*)
-

Table des matières

1	Introduction générale	17
1.1	Un Ecosystème anthropisé	19
1.2	Eutrophisation & Dystrophie	23
1.3	Modification des concentrations en sels nutritifs sur le continuum Seine . .	28
1.4	Phytoplancton	29
1.5	Photosynthèse	36
1.5.1	Généralités et structures	36
1.5.2	Absorption & fluorescence	40
1.5.3	Régulation de la production primaire	42
1.6	Contexte & Problématique	45
2	Étude d'un cas d'efflorescence de <i>Lepidodinium chlorophorum</i> en Baie de Seine.	49
2.1	Résumé	51
2.2	Introduction	54
2.3	Material and Methods	56
2.3.1	High frequency measurements using an instrumented buoy	56
2.3.1.1	List of measurements performed at high frequency by the buoy	56
2.3.1.2	High-frequency measurements of inorganic nutrients	57
2.3.1.3	High frequency photosynthetic measurements	57
2.3.2	Enrichment experiment	58
2.3.3	Photosynthetic measurements	59
2.3.4	Flow cytometry	59
2.3.5	Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)	60
2.3.6	Chlorophyll-a measurements	61
2.3.7	Transparent exopolymeric particles (TEP)	61
2.3.8	Alkaline phosphatase activity (APA)	61
2.3.9	Statistical and data analysis	61
2.4	Results	62
2.4.1	Bloom time series	62
2.4.2	Incubation results	65
2.5	Discussion	69

2.5.1	Conclusions	73
3	Indication de co-limitation de la croissance phytoplanctonique en baie de Seine avec une approche RUE	77
3.1	Résumé	79
3.2	Introduction	83
3.3	Materials and Methods	84
3.3.1	Measurements in the Bay of Seine	84
3.3.2	Enrichment experiment	84
3.3.3	Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)	85
3.3.4	Chlorophyll- <i>a</i> measurements	85
3.3.5	Transparent exopolymeric particles (TEP)	86
3.3.6	Alkaline phosphatase activity (APA)	86
3.3.7	Fluorometry to assess photosynthetic parameters	86
3.3.8	Flow cytometry	87
3.3.9	RUE calculation	88
3.3.10	Statistical analysis	89
3.4	Results and discussion	90
3.4.1	Environmental parameter in the Bay	90
3.4.2	Phytoplankton growth link with nutrient balance	91
3.4.3	Limitation assessment by physiological parameter	92
3.4.3.1	APA - TEP	92
3.4.3.2	Maximun quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) .	94
3.4.4	Phytoplankton community	95
3.4.5	Multivariate analysis and overall trend	95
3.4.6	Link between RUE and the phytoplankton community	97
3.5	Conclusion	99
4	Facteurs de contrôle de la production et de la structure de communauté du phytoplancton en Estuaire de Seine	105
4.1	Résumé	107
4.2	Introduction	112
4.3	Material and Methods	114
4.3.1	Estuary transect & sampling strategy	114
4.3.2	Fixed point high frequency data : oxygen and flow	115
4.3.3	High frequency photosynthetic measurements	115
4.3.4	Integrating primary production	116
4.3.5	Flow cytometry	117
4.3.6	Measurement of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)	117
4.3.7	Chlorophyll- <i>a</i> measurements	117
4.3.8	Statistical and data analysis	118
4.3.9	Environmental parameters & eutrophication effect	119
4.3.10	Nutrient excess and dystrophy	120

4.3.11	Phytoplankton diversity	120
4.3.12	Photosynthetic parameters & primary production pattern	122
4.4	Discussion	126
4.4.1	Continuation of the eutrophication effect ?	126
4.4.2	Phytoplankton community structure and shift	127
4.4.3	Drivers of primary production	127
4.5	Conclusions	129
5	Effet de la dystrophie sur les capacités photosynthétiques, la structure de communauté et la physiologie du phytoplancton	135
5.1	Résumé	137
5.2	Introduction	140
5.3	Material and Methods	141
5.4	Result and discussion	142
5.4.1	Consumption and production in dystrophic condition.	142
5.4.2	Limitation and physiological responses.	143
5.4.3	Functional diversity change	144
5.4.4	Effect of community change and dystrophy on photosynthesis . . .	145
5.5	Conclusion	146
5.6	Supplementary information	149
5.6.1	Extended material & method.	149
5.6.2	Extended Result & discussion.	153
6	Discussion générale	159
6.1	facteur de contrôle en estuaire de Seine	162
6.2	Limitation et dystrophie en Baie de Seine	165
6.3	Indicateur de dystrophie	167
6.4	Interaction dystrophie - Biodiversité - Production	171
	Bibliographie	174
	Table des figures	225
	Liste des tableaux	231
	Annexe A Matériel & Méthodes	233
	Annexe B Publication	247

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Un Ecosystème anthropisé

La Manche est une mer épicontinentale se situant entre la France et le Royaume-Uni et faisant la jonction entre l'Atlantique à l'Ouest et la mer du Nord à l'Est. Ce système est dominé par les marées (macrotidal) avec un courant d'Ouest en Est à l'image d'une rivière centrale bordée de nombreux tourbillons qui découlent de la géographie des côtes et des îles (Ménèsguen & Gohin, 2006; Orbi & Salomon, 1988) (Fig. 1). On peut séparer cette mer en deux bassins avec une frontière au niveau de la péninsule du Cotentin (Dauvin, 2012) : dans le bassin de l'Est qui est moins profond avec un maximum à 100 m, la température varie de 5 à 23 °C en faisant un système tempéré. L'hydrologie est un facteur important de la dynamique de la Manche. Avec un important hydrodynamisme, un brassage et une faible profondeur, il n'y a pas de stratification thermique dans la colonne d'eau et l'eau y est aussi plus turbide que dans le bassin Ouest.

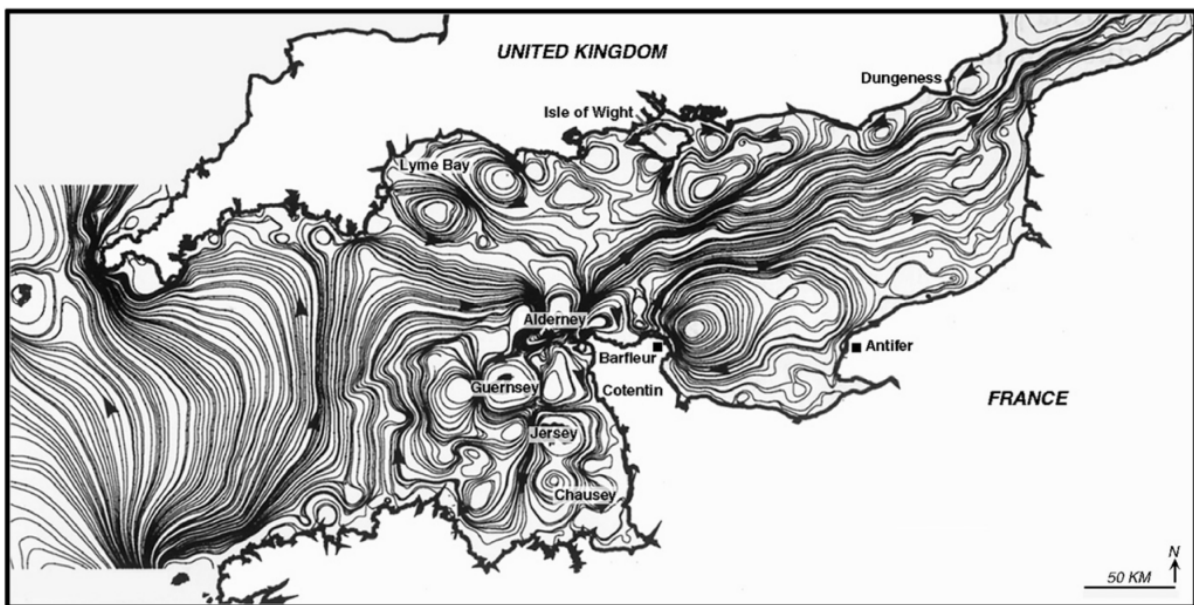


FIGURE 1 – Cartographie des courants résiduels en baie de Seine (Orbi & Salomon, 1988).

Au Sud du Bassin Est se trouve la baie de Seine, un écosystème côtier délimité à l'Ouest par la pointe de Barfleur et à l'Est par le cap de la Hève (Fig. 2). D'une surface d'environ 4000 km² avec un marnage important à l'image de la Manche, la baie a une profondeur maximale de 30 m. La baie de Seine à l'image des autres systèmes côtiers fortement influencés par les apports des fleuves, est moins salée, plus chaude et surtout plus riche en sels nutritifs que les eaux du large. À côté de la Seine qui représente 85 % des apports d'eau douce de la Baie (Aminot et al., 1997), on trouve la Touques, l'Orne, la Vire, la Dives qui peuvent avoir des influences locales marquées (Lemesle et al., 2015) (Fig. 2).

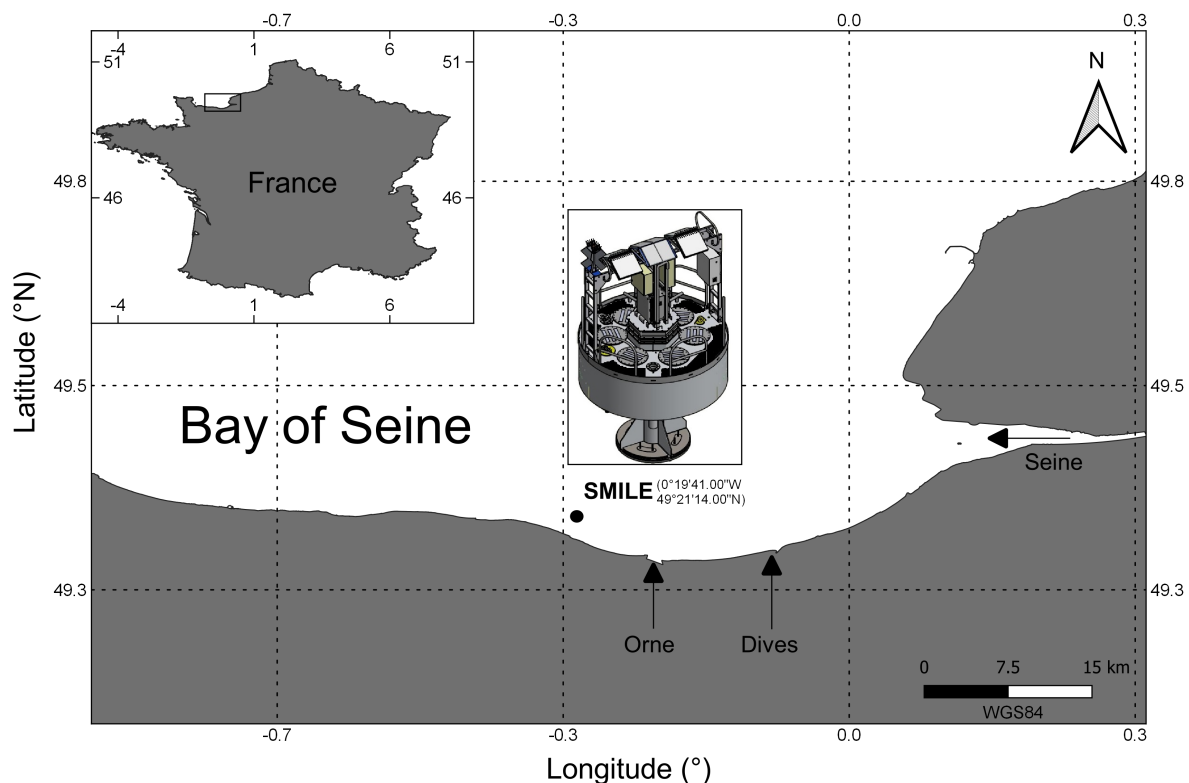


FIGURE 2 – Carte de la baie de Seine avec l’emplacement de la bouée SMILE.

Le bassin versant de la Seine s’étend sur 75 000 km² (14 % du territoire français) avec une population de 18,3 millions d’habitants (27 % de la population française). La Seine prend source dans le plateau de Langres et se jette dans la Baie 773 km plus loin. La jonction entre la Seine fluviale et la baie de Seine est un estuaire de 160 km de long (Fig. 3). Depuis l’estuaire jusqu’à la Manche, ce continuum terre-mer est fortement anthropisé. Or les écosystèmes côtiers et les estuaires remplissent de nombreux services écosystémiques : régulation du climat, nourriceries, production d’énergie (Raoux et al., 2020), pêcheries, nurseries, réduction des effets d’événements extrêmes (inondation et tempête), rôle dans les cycles biogéochimiques, séquestration de carbone, assainissement de l’eau (Barbier, 2017; Basset et al., 2013; Chen & Borges, 2009; Daniell et al., 2020; Lorey, 2003; O’Higgins et al., 2010). Les écosystèmes côtiers (comprenant les estuaires) représentent 7 à 10 % des océans globaux pour 10 à 30 % de la production primaire marine globale (Bauer et al., 2013; Laruelle et al., 2013; Robinson & Brink, 2005) qui va soutenir le reste du réseau trophique.



FIGURE 3 – Carte de l'estuaire de la Seine (GIP, <https://www.seine-aval.fr/>).

La majorité de ces services se retrouvent dans la zone de baie de Seine avec une pêche importante (Carpentier et al., 2009; Fritsch et al., 2007), notamment de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) (jusqu'à 67 000 t exploitables par an) et de la conchyliculture d'huîtres creuses (*Magallana gigas*) et de moules (*Mytilus edulis*) (Emmery et al., 2017; Marín Leal et al., 2008) à l'ouest de la baie. De nombreux sites d'hivernages pour oiseaux d'eaux sont présents, différentes populations de mammifères marins vivent également en baie de Seine (phoque veau marin, phoque gris, marsouin commun, dauphin commun, grand commun). La Manche est une zone d'échanges maritimes importante avec 20 % du trafic mondial et le cinquième port nord-européen (HAROPA) qui regroupe les ports du Havre, de Rouen et de Paris qui font de la baie et l'estuaire, des zones à forts enjeux socio-économiques en terme de logistique à l'échelle nationale et européenne. Cette activité portuaire impose de nombreux clapages en baie et depuis 2020 en estuaire qui viennent s'ajouter aux pressions liées à l'extraction de granulats dans la baie (Baux et al., 2017; Dauvin, 2019). La Normandie est également la troisième région touristique de France (Insee) qui profite de la présence de plusieurs sites classés UNESCO et du tourisme mémoriel de la seconde guerre mondiale. De nouvelles pressions anthropiques liées à la mise en place de trois parcs éoliens en baie de Seine vont apparaître prochainement, les travaux du premier parc situé au large de Courseulles-sur-Mer ont déjà commencé. L'ensemble de ces pressions anthropiques peuvent affecter les services rendus par les écosystèmes de la baie et de l'estuaire de Seine comme décrit dans de nombreux écosystèmes côtiers (Barbier et al., 2011; Breitburg et al., 2018; Viles & Spencer, 2013).

Dans ce contexte, les cycles biogéochimiques sont particulièrement affectés par les apports d'origines anthropiques issus de l'agriculture, des industries, des zones urbaines. Ces apports ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies en fonction du développement économique et des réglementations. Ces excès en sels nutritifs le long du continuum terre-mer ont un effet direct sur les communautés de producteurs primaires, pouvant entraîner une eutrophisation des écosystèmes aquatiques et avoir des effets directs sur les nombreux services écosystémiques de l'estuaire et la baie avec des conséquences écologiques et économiques (Barbier et al., 2011).

1.2 Eutrophisation & Dystrophie

Actuellement il n'y plus aucun doute sur le fait que l'Homme modifie l'environnement et son écosystème [IPCC 2021, Allan et al. (2021)]. L'histoire humaine a donc un effet majeur sur l'ensemble de la biosphère y compris aquatique à différentes échelles (López-Blanco et al., 2020; Siano et al., 2021) au point d'appeler notre époque géologique "l'Anthropocène" (Crutzen, 2006). Les cycles biogéochimiques ont donc été profondément modifiés (Vitousek et al., 1997), en particulier ceux du carbone (C), du phosphore (P) et de l'azote (N). Une amplification de ces modifications à l'échelle globale en lien avec le développement économique, démographique et de la globalisation des échanges est à prévoir dans le futur (Kroeze et al., 2013) dans un contexte de changement climatique qui influence également ces cycles.

Au début du 20^{ème} siècle le terme eutrophe (du grec *eutrophos* "bien-nourris") a été inventé par Weber (1907) pour classer les états de la flore des tourbières. Quelques années plus tard, le terme est utilisé cette fois ci pour des milieux aquatiques alors que la catégorisation s'appuie sur l'apparence de l'eau et la présence des différents groupes phytoplanctoniques (Naumann, 1919). En même temps, on observe alors déjà les conséquences de l'eutrophisation comme la baisse d'oxygène dans la couche inférieure (hypolimnion) de lacs (Thienneman, 1918) mais il ne s'agit que des prémices de cette science. Il faudra attendre les années 50 et la "révolution verte" avec l'agriculture intensive grâce au procédé de synthèse de l'ammonium Haber-Bosch (Smil, 2004) permettant de fabriquer des engrais azotés (Équation. 1) pour voir les effets de la fertilisation excessive des sols sur les systèmes aquatiques. Les conséquences sont alors plus évidentes et rapidement les mécanismes sont étudiés et la définition de l'eutrophisation se précise. (Rodhe, 1969; Rohlich, 1980).



Nixon (1995) décrit l'eutrophisation comme "une augmentation du taux d'apport de matière organique", mais la définition va évoluer, avec en particulier l'ajout du terme "anthropique" et un accent mis sur le rôle du N et du P (Hasler, 1947), puis la prise en compte des conséquences plus globales de l'eutrophisation vont également être considérée. En 2017, suite à une expertise scientifique collective (ESCo) sur la problématique de l'eutrophisation, Pinay et al. (2017) ont proposé une définition de l'eutrophisation anthropique qui comportait la synthèse de ces éléments : "Syndrome d'un écosystème aquatique associé à la surproduction de matières organiques induit par des apports anthropiques en phosphore et en azote. La notion de syndrome, qui se définit comme un ensemble de symptômes, est utilisée pour pallier la difficulté à résumer en quelques mots la multitude de réponses biogéochimiques et biologiques engendrée par des apports d'azote et de phosphore. Les effets principaux associés à l'eutrophisation anthropique sont les proliférations végétales parfois toxiques et les anoxies. Avant ces signaux, l'eutrophisation a souvent

déjà modifié les compartiments biologiques de l'écosystème, des producteurs primaires jusqu'aux animaux supérieurs, altérant sa diversité, son fonctionnement écologique et les services rendus. La nature et l'intensité des réponses dépendent aussi de facteurs environnementaux, tels que la lumière, le temps de résidence et la température.". À noter que le terme d'eutrophisation "culturelle" (Smith & Schindler, 2009) est parfois utilisé pour discriminer l'eutrophisation "naturelle" de celle provoquée par les activités anthropiques.

Comme mentionnée ci-dessus, le processus d'eutrophisation est provoqué par un enrichissement du milieu en sels nutritifs (Fig. 4), généralement des nitrates et du phosphate. Ces apports excessifs vont provoquer une augmentation de la croissance et de la biomasse des producteurs primaires qui ne seront plus limités dans leur croissance par les sels nutritifs. Après une phase de croissance exponentielle, ces producteurs primaires vont rentrer en phase stationnaire puis de sénescence et leur biomasse va être décomposée par des organismes hétérotrophes. Cette décomposition consomme de l'oxygène dû à la respiration pouvant dans certains cas résulter/entraîner des baisses d'oxygène allant jusqu'à l'hypoxie sévère, [$< 2 \text{ mg.l}^{-1}$, Diaz & Rosenberg (2008)] voir l'anoxie (Breitburg et al., 2018; Diaz & Rosenberg, 2008; Rabalais et al., 2009). Mais d'autres conséquences sont aussi associées à l'eutrophisation. Sans être exhaustif, les conséquences suivantes sont décrites dans la littérature : changement de la structure des communautés de producteurs primaires ; augmentation de la biomasse des prédateurs des producteurs primaires et donc modification des réseaux trophiques, augmentation de la biomasse de microalgues toxiques, (Wetzel, 2001), prolifération de cyanobactéries toxiques (Catherine et al., 2013), augmentation de la biomasse des méduses (*Jellyfication*) (Purcell, 2012), perte de diversité, interactions avec d'autres contaminants, (Roessink et al., 2008, 2010), acidification des milieux (Murphy, 2002), augmentation de la turbidité (Smith et al., 2006; Smith & Schindler, 2009). L'eutrophisation a ainsi des conséquences sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques à plusieurs échelles spatiales et temporelles.

Comme l'eutrophisation est induite par l'introduction de sels nutritifs dans les milieux aquatiques, une des problématiques importante associée à l'eutrophisation, au-delà des flux et de la concentration de ceux-ci, est l'équilibre des éléments entre eux. En milieu aquatique, la distribution des sels nutritifs suit un équilibre généralement décrit par le rapport de Redfield C:N:P 106:16:1 (Redfield, 1958). Le rapport de Redfield est le rapport atomique moyen qui existe entre le carbone, l'azote et le phosphore présent dans le phytoplancton marin et dans l'océan profond. Ce rapport permet de définir si le rapport entre les sels nutritifs observé dans un écosystème est équilibré ou non. Ainsi, l'anthropisation modifie la quantité des sels nutritifs présents dans l'eau et éventuellement leurs rapports. D'un point de vue global, l'eutrophisation est une problématique apparue dans les années 50 et généralisée à de nombreux systèmes marins dans le monde (Minghui et al., 1990; Nwankwegu et al., 2020). Les écosystèmes marins côtiers alors historiquement limités en N suite à ces enrichissements vont basculer vers une limitation en P (Fisher et al., 1992; Xin et al., 2019) et être massivement déséquilibrés. Cela provoque notamment une aug-

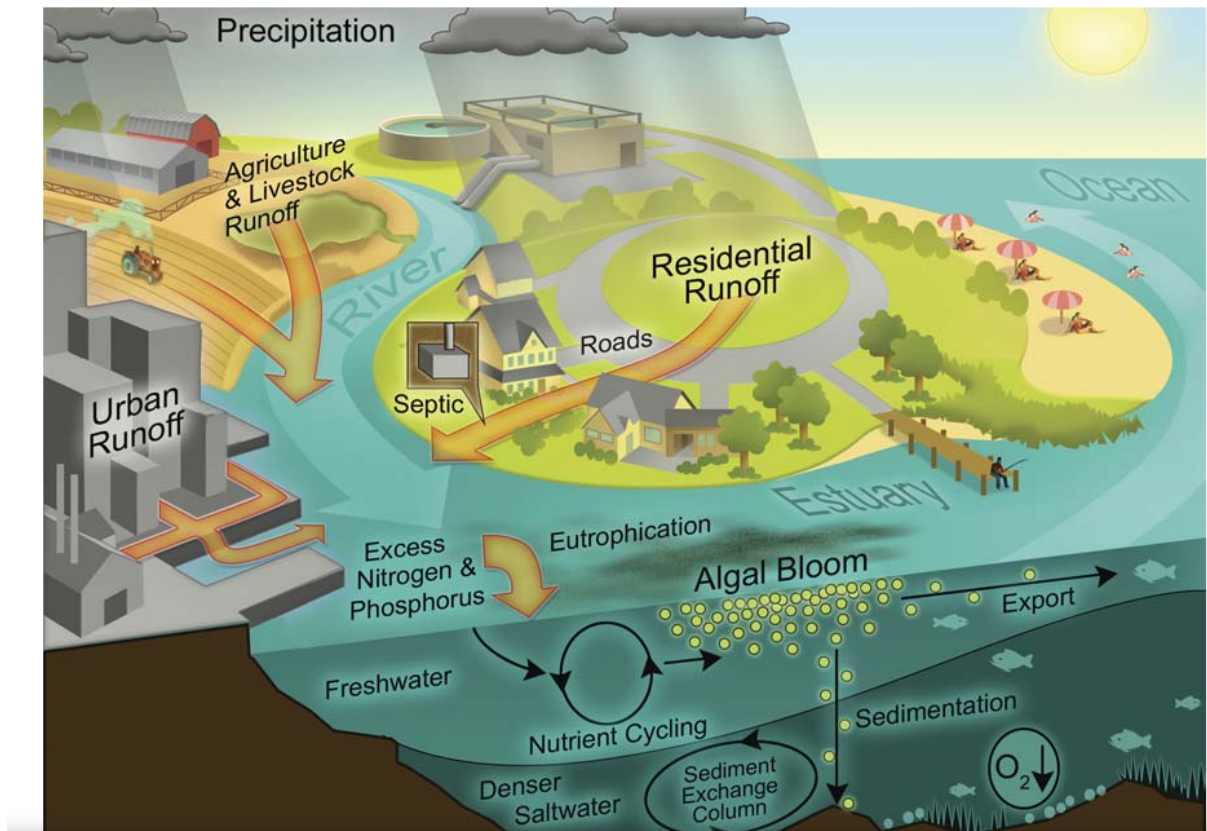


FIGURE 4 – Schéma décrivant le processus d'eutrophisation anthropique et ses conséquences (Paerl, 2008).

mentation des ratios N:P et N:Si indiquant alors un excès d'azote pour une limitation en phosphore et/ou en silice. En général une attention particulière est portée au N:P car plus universel que le rapport N:Si qui concerne les communautés phytoplanctoniques siliceuses en particulier les diatomées. Le déséquilibre dans les ratios de sels nutritifs, c'est à dire l'écart au rapport de Redfield est appelé dystrophie.

Cette dystrophie peut être aggravée dans un cas précis : la dés-eutrophisation. Pour réduire l'effet d'eutrophisation et restaurer les écosystèmes, la solution la plus directe est de réduire l'apport des sels nutritifs, c'est à dire le phosphore et l'azote inorganique (Ménèsquen et al., 2018b). Or, comme les producteurs primaires ont besoin à la fois de N et de P pour leur croissance, il suffirait en théorie d'abattre seulement les quantités d'un des deux : N (Howarth & Marino, 2006) ou P (Carpenter, 2008) pour réduire l'eutrophisation. Or pour réduire les apports dans les écosystèmes aquatiques, il y a deux solutions : soit réduire l'utilisation et donc les flux, soit traiter l'eau rejetée dans les cours d'eau. Pour des raisons d'efficacité et de coûts, la solution la plus utilisée par les gestionnaires est le traitement des orthophosphates dans l'eau. Cette solution est particulièrement adaptée aux zones urbaines via le traitement en station d'épuration (Clark, 1971; Howarth, 2008; Håkanson & Bryhn, 2010). Cependant la question de l'efficacité de la réduction seule du

P a été largement débattue notamment pour les lacs (Cotner, 2017; Schindler et al., 2016, 2017) sans arriver à un consensus, certains soutenant l'hypothèse qu'il faut réduire à la fois le N et le P pour arriver à une efficacité suffisante.

Néanmoins la réduction des apports en P via le traitement des eaux usées a été généralisée en Europe (Artioli et al., 2008; Burson et al., 2016) comme solution pour tenter de réduire l'eutrophisation. Ces changements récents ont ainsi modifié à nouveau la composition des sels nutritifs augmentant les ratios N:P et N:Si (Burson et al., 2016; Westphal et al., 2020). La dystrophie est donc intimement liée à la problématique d'eutrophisation (Penuelas et al., 2020; Peñuelas & Sardans, 2022) et est la résultante des pratiques agricoles et industrielles ainsi que celle de la réglementation.

Le premier compartiment à réagir aux modifications de sels nutritifs est le phytoplancton (Santhanam et al., 2019; Topcu & Brockmann, 2021). Une attention particulière doit donc être portée à ce compartiment pour étudier les effets de l'eutrophisation et de la dystrophie. Enfin, considérer l'eutrophisation seulement comme la réaction directe à un enrichissement des communautés de producteurs primaires serait lacunaire, beaucoup d'autres phénomènes rentrent en compte notamment la variabilité spatiale et temporelle de l'environnement des écosystèmes et des autres forçages (température, lumière, hydrodynamisme, contaminants, espèces non indigène etc.). Pour appréhender cette problématique, il faut donc avoir la vision la plus complète possible et favoriser des approches holistiques (Nixon, 2009; Paerl et al., 2014). Ainsi dans le cas de cette étude, il est essentiel de considérer cette problématique sur le continuum. (Le Moal et al., 2019) (Fig. 5).

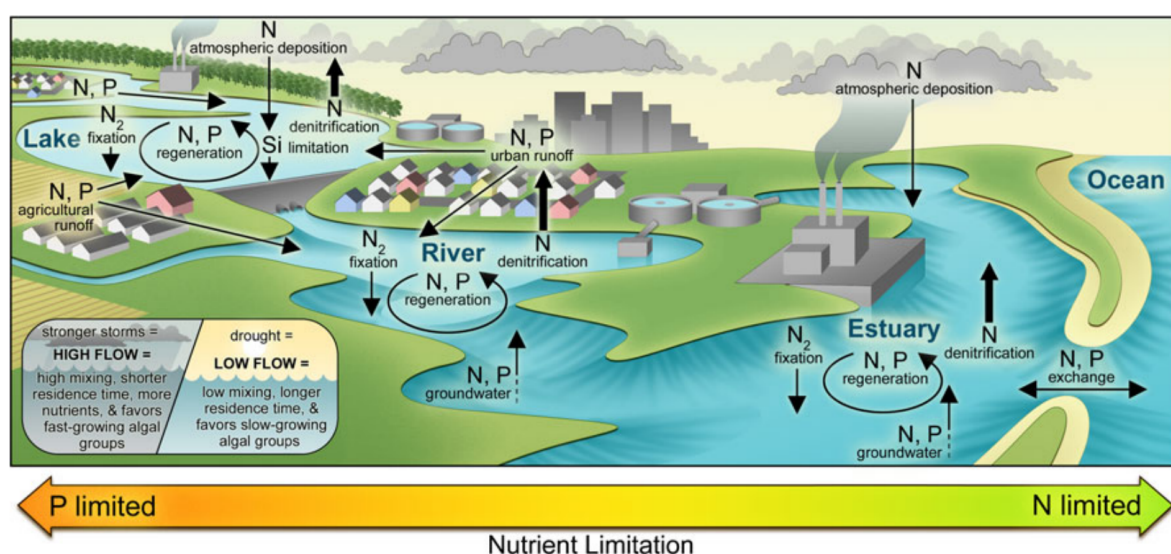


FIGURE 5 – Schéma du continuum de l'eutrophisation (Paerl et al., 2014).

Boite 1 : Eutrophisation & Changement climatique

Les rejets massifs de gaz à effet de serre d'origine anthropique dans l'atmosphère à l'époque industrielle engendrent un changement climatique global. La première conséquence de ce phénomène est un réchauffement des systèmes aquatiques (Minx et al., 2021). La température étant un facteur clé dans la croissance des organismes et en particulier du phytoplancton, un effet synergique entre eutrophisation et le changement climatique est attendu. (Meerhoff et al., 2022; Moss et al., 2011).

Le réchauffement des eaux va influencer profondément la dynamique du phytoplancton (Grimaud et al., 2017; Young & Schmidt, 2020; Zohary et al., 2021), ainsi que celle de la boucle microbienne directement impliquée dans le devenir de la matière et la désoxygénation des eaux (Boscolo-Galazzo et al., 2018). L'augmentation de la température joue directement également sur les conditions physiques en augmentant la stratification des eaux (Azadi et al., 2021). Ces changements pourront avoir des conséquences importantes compte tenu du rôle majeur de ce compartiment dans la pompe biologique de carbone à l'échelle globale (Basu & Mackey, 2018). L'eutrophisation aussi peut influencer le changement climatique (Li et al., 2021a) : La levée des limitations en nutriment pourrait aggraver le changement climatique (Edwards et al., 2016). En effet, l'augmentation des précipitations et des événements hydrologiques extrêmes peuvent engendrer plus d'anoxie et ainsi libérer plus de dioxyde de carbone et de méthane (Brothers et al., 2014; DelSontro et al., 2018).

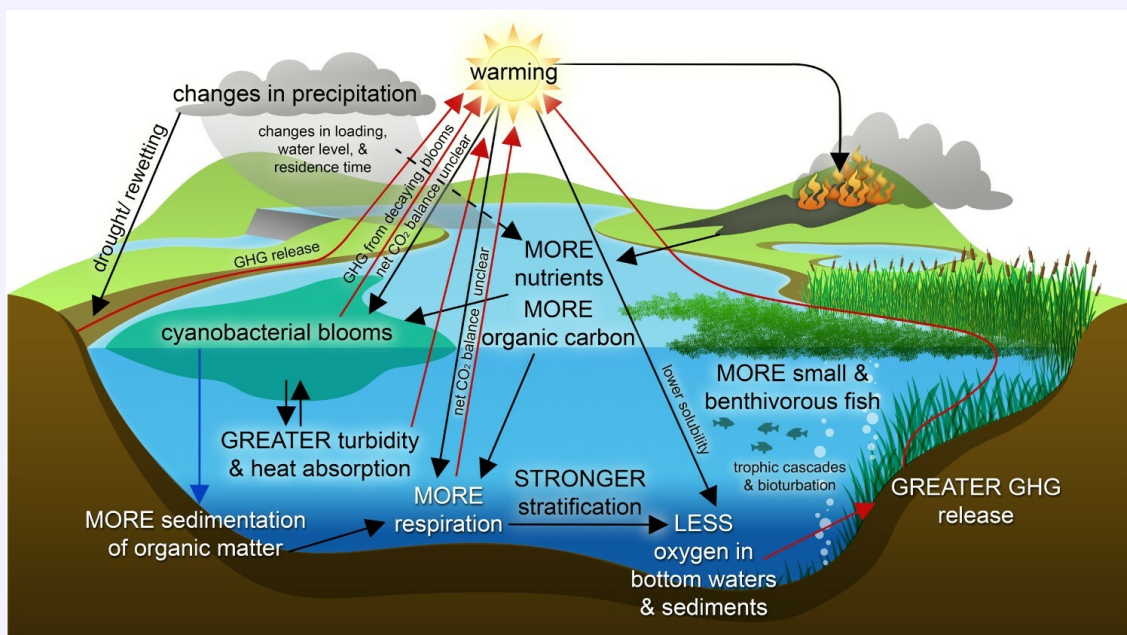


FIGURE 6 – Principales boucles de rétroaction positive du changement climatique et de l'eutrophisation (Meerhoff et al., 2022).

1.3 Modification des concentrations en sels nutritifs sur le continuum Seine

Depuis 1950, les quantités d'azote (N) et de phosphore (P) présentent dans la Seine augmentent en parallèle de la démographie (Billen et al., 2007) or la Seine alimente la baie en sels nutritifs (Aminot et al., 1997). Ces enrichissements en sels nutritifs sont majoritairement dus à l'agriculture pour l'azote et aux rejets d'eaux usées domestiques et industrielles pour le phosphore (Romero et al., 2013). Dès l'année 1964, la législation française crée les Agences de l'eau chargées de la préservation et de la reconquête du bon état de la ressource aquatique, en 2000 la directive-cadre sur l'eau (DCE) permet l'adoption d'une politique globale européenne sur la gestion de l'eau. La DCE considère plusieurs indicateurs (physico-chimique, hydromorphologique et écologique) afin de viser le "bon état" de ces masses d'eau, notamment par la réduction des sels nutritifs en excès dans ces bassin hydrographiques.

Dans les années 1990 suite à l'amélioration du traitement des eaux de rejets sur la Seine, les quantités de phosphate ont été réduites provoquant par conséquence une baisse en P dans l'estuaire et la baie de Seine (Romero et al., 2013). Mais les concentrations en azote restent à un niveau élevé dues aux activités anthropiques, cela entraîne alors un déséquilibre dans le rapport des deux sels nutritifs avec une augmentation du rapport N:P. Avec la température, le ratio N:P est le seul paramètre physico-chimique ayant connu une forte augmentations entre 2008 et 2019 (Lefran et al., 2021). La baie de Seine est donc un cas caractéristique de ces écosystèmes côtiers ayant observé des modifications importantes de leurs compositions en sels nutritifs lors des dernières décennies (Ibáñez & Peñuelas, 2019).

La silice qui est aussi un des sels nutritifs majeur pour la croissance des diatomées n'a pas évoluée malgré l'activité anthropique. La silice peut être modifiée dans certains cas par l'activité humaine comme par la rétention liée aux barrages (Struyf & Conley, 2009) mais dans le cas de la Seine comme la plupart des apports de silice proviennent des cycles géochimiques, l'activité humaine n'a que très peu modifiée ces flux dans l'estuaire (Billen et al., 2007; Garnier & Billen, 2007; Sferratore et al., 2006).

1.4 Phytoplankton

Le phytoplankton (du grec "plantes-errantes") désigne un groupe fonctionnel [*sensu* Solbrig (1994)] englobant les microorganismes photo-autotrophes unicellulaires présent dans la colonne d'eau (Reynolds, 2006), ces organismes peuvent être motiles c'est à dire capables de se déplacer mais sans aller contre le courant. Cette communauté d'organismes est à la base des systèmes aquatiques aussi bien marins que dulçaquicole (Smith et al., 2006). Les espèces phytoplanktoniques sont capables de réaliser la photosynthèse oxygénique grâce à la chlorophylle *a* (chl *a*) décrite en 1818 par Caventou & Pelletier (Khalyfa et al., 1992), et d'un éventail de pigment accessoire. Ces organismes se reproduisent par divisions cellulaires avec des taux de croissance pouvant dépasser une division par jour (Dugenne et al., 2014) en faisant un compartiment biologique très dynamique (Thyssen et al., 2014).

La diversité de la structure des communautés de phytoplankton dans les écosystèmes aquatiques est un point central de beaucoup de problématiques écologiques (Van der Plas, 2019). Cette diversité impacte l'assimilation de carbone et la vitesse de consommation des nutriments (López-Sandoval et al., 2014; Striebel et al., 2009)(Striebel, 2009; Lopez-Sandoval et al., 2014), la respiration (López-Sandoval et al., 2014), l'efficacité d'utilisation de la ressource (RUE) (Chai et al., 2020). De manière générale, la théorie biodiversité - fonctionnement de l'écosystème (BEF) (Tilman et al., 2014) montre que l'augmentation de la biodiversité a un effet positif sur de nombreux processus (Gonzalez et al., 2020; Harrison et al., 2014; Oliver et al., 2015; Van der Plas, 2019). Tout comme pour l'eutrophisation, il n'y a pas de définition arrêtée pour le terme de biodiversité (Mayer, 2006). Le concept de biodiversité est grossier et englobe en général plusieurs définitions connotées (Cipullo, 2016; Flynn et al., 2011; Hamilton, 2005; Lean, 2017; Moustakas & Karakassis, 2005; Raffard et al., 2019; Tucker et al., 2017) basées principalement sur la génétique ou les fonctions.

En termes de classification phylogénétique, le phytoplankton est un groupe paraphylétique dispersé dans de nombreuses lignées d'eucaryotes et un groupe de procaryotes (Fig. 7). Déterminer un nombre d'espèce pour ce groupe est complexe, par les méthodes descriptives de morphologie environ 5000 espèces sont reconnues (Simon et al., 2009; Sournia et al., 1991; Tett & Barton, 1995) quand certaines estimations estiment que 10 000 000 pourraient exister (Norton et al., 1996). Les espèces du phytoplankton sont majoritairement composées d'espèces eucaryotes, les procaryotes sont des cyanobactéries ou dans le milieu marin deux genres sont les principaux représentants : *Prochlorococcus* peu présent en Manche et *Synechococcus*. En milieu dulçaquicole, les cyanobactéries sont beaucoup plus diverses (Mishra et al., 2018).

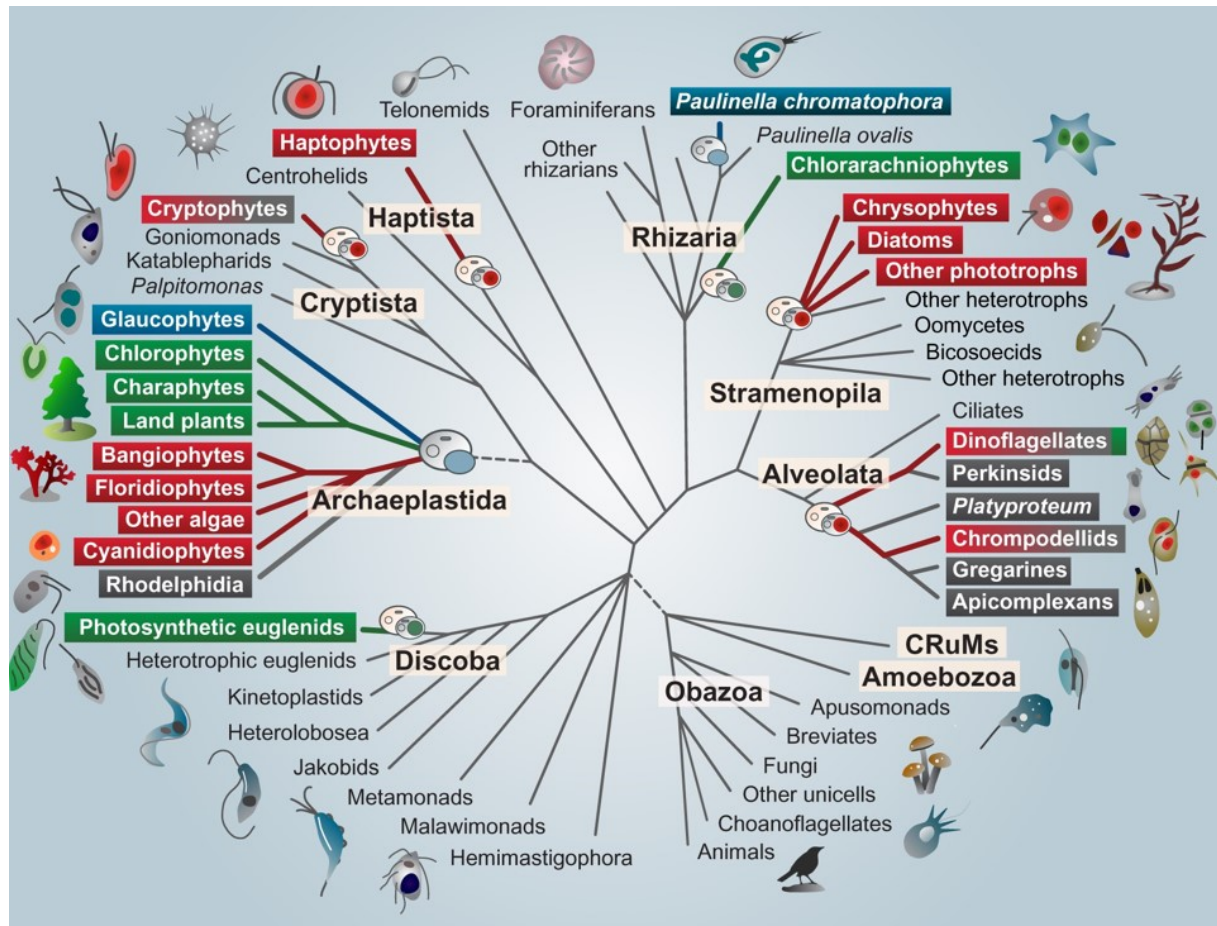


FIGURE 7 – Arbre phylogénétique représentant la distribution des taxons photosynthétiques eucaryotes (en couleur) (McGrath, 2020).

L'histoire évolutive des organismes photosynthétiques montre que les cyanobactéries sont à l'origine du chloroplaste des eucaryotes marins qui via l'endosymbiose primaire (il y a 1,5 milliard d'années) a donné les Archeplastida. Les endosymbioses secondaires et tertiaires seront ensuite les moteurs évolutifs qui donneront la diversité des autres lignées des eucaryotes photosynthétiques qui explique largement la palette pigmentaire des algues (Fig. 8).

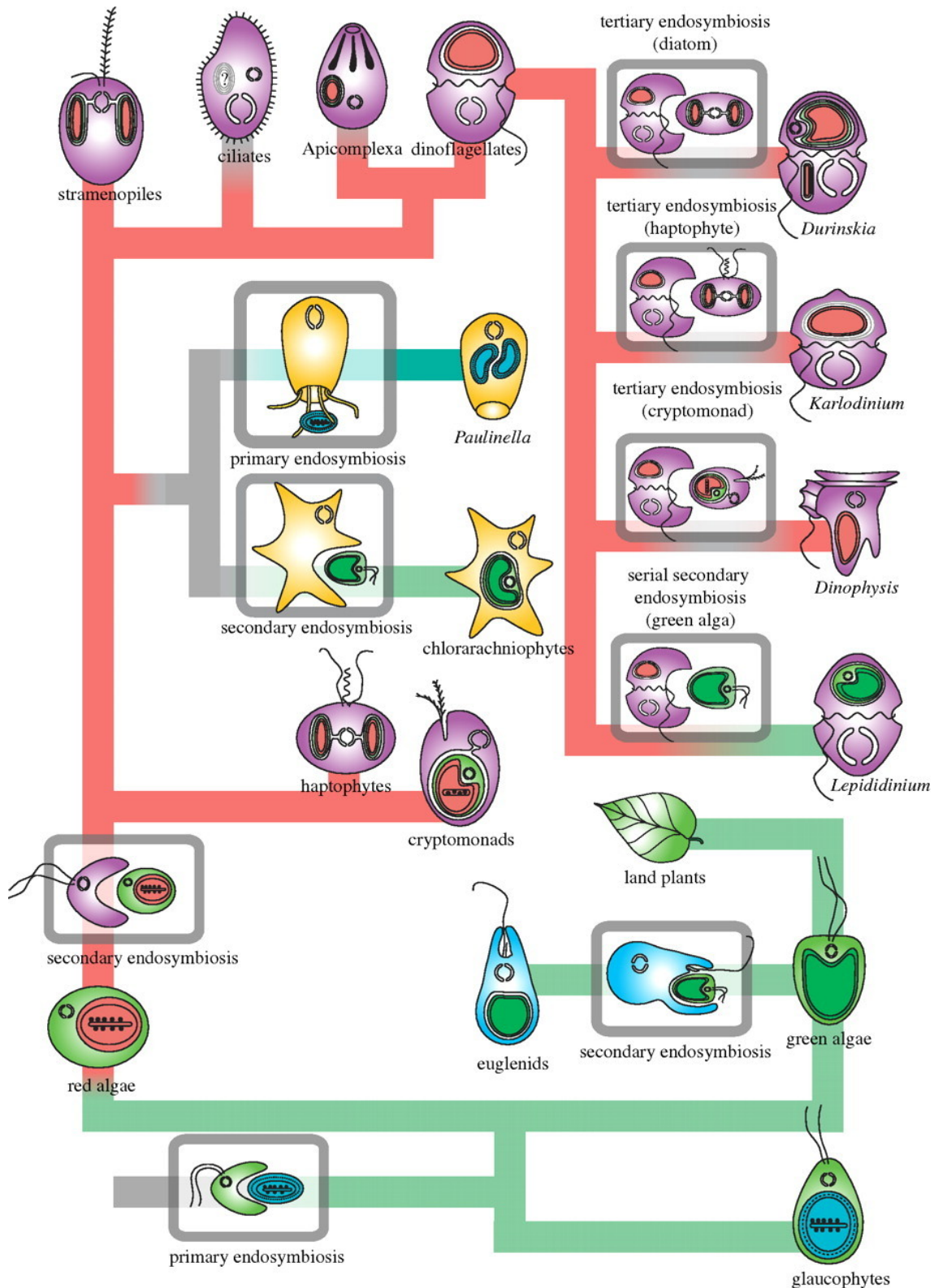


FIGURE 8 – Schéma de l'évolution des plastes chez les eucaryotes, les endosymbioses sont représentées par des carrés gris. Les lignes colorées désignent les lignées des algues vertes (ligne verte) et des algues rouges (ligne rouge). L'endosymbiose primaire (en bas) a créé les trois lignées principales : algues rouges, vertes et glaucophytes (Keeling, 2010).

Plusieurs méthodes existent pour estimer la diversité du phytoplancton, la plus classique est l'analyse par microscopie optique (Wollschläger et al., 2015) qui permet uniquement une identification et un dénombrement des genres voire des espèces de plus grosses cellules du phytoplancton (microphytoplancton) et qui occulte les plus petites classes de taille et les espèces cryptiques. D'autres méthodes de microscopie encore plus lourdes peuvent aussi être employées comme par exemple la microscopie électronique à balayage ou à transmission (Krueger-Hadfield et al., 2014) pour caractériser certaines espèces. Ces méthodes d'identification par microscopie outre la difficulté à appréhender toutes les classes de taille, rencontrent rapidement des contraintes très fortes : elles nécessitent des experts, l'analyse est extrêmement chronophage et donc très onéreuse en temps. Des méthodes moléculaires sont de plus en plus employées : PCR quantitative (qPCR) et puce à ADN (Danovaro et al., 2016), metabarcoding ADN qui permettent d'améliorer l'analyse des espèces plus petites, cryptiques, ou rares (Abad et al., 2016; Tragin & Vaulot, 2019) mais elle génère des données extrêmement riches qui sont souvent difficile à interpréter.

D'autres indicateurs de diversité fonctionnelle et spécifique plus grossiers peuvent être obtenus de manière plus simple et automatisés. Les espèces phytoplanctoniques possèdent de nombreux pigments : chl *a*, chl *b*, chl *c*₁, chl *c*₂, *d* (Allakhverdiev et al., 2010; Ohashi et al., 2008), chl *f* (Chen et al., 2010), caroténoïdes (Takaichi, 2011) et phycobilibiprotéines (phycocyanine et phycoérythrine) (Fig. 10). La proportion et répartition de ces pigments peuvent être utilisées afin d'estimer des indicateurs de diversité. Ces méthodes peuvent être étudiées directement via la quantification des pigments en utilisant des méthodes de chromatographie (HPLC) (Jeffrey et al., 1999) ou en exploitant la signature de la fluorescence issue de l'excitation de ces pigments (Proctor & Roesler, 2010), ces méthodes peuvent aussi être utilisées via satellite en se servant des paramètres de réflectance (Kvaterniuk et al., 2019).

Les cellules phytoplanctoniques présentent une grande variété de formes (Hillebrand et al., 1999; Saccà, 2017) et leurs tailles varient sur plusieurs ordres de grandeur de 1 μm^3 et jusqu'à 10⁹ μm^3 (Beardall et al., 2009), les principales classes de taille sont en général décrites par les termes de picophytoplancton (< 2 μm), nanophytoplancton (2-20 μm), microphytoplancton (20 - 200 μm) et pour quelques rares espèces le meso-macrophytoplancton (0,2 - 20 mm) (Sieburth et al., 1978). Des méthodes permettent de mesurer la taille des particules par diffraction laser permettant ainsi d'avoir la distribution de taille de la communauté du phytoplancton (Olson et al., 1993).

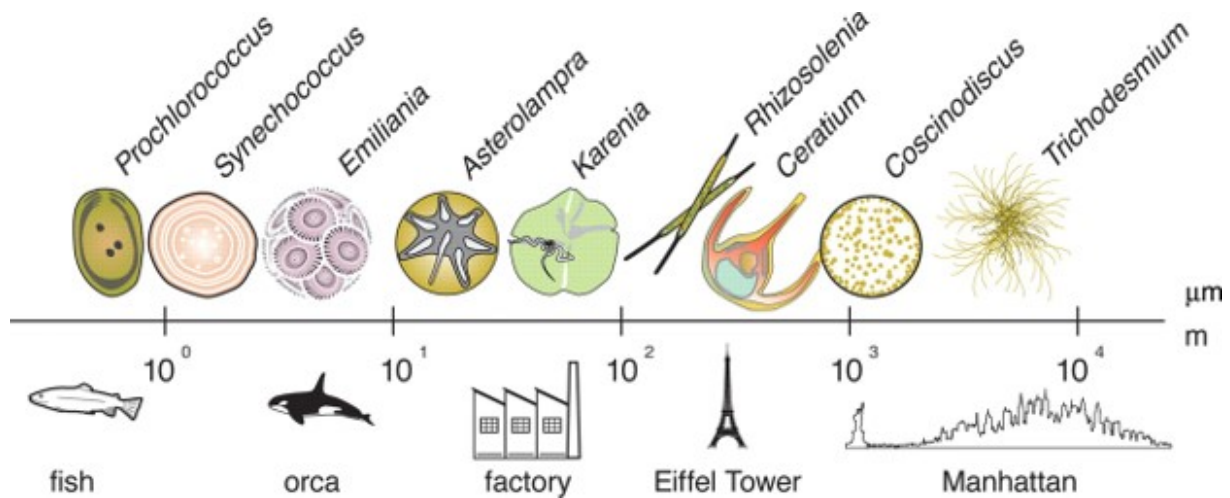


FIGURE 9 – Représentation schématique des ordres de grandeur de taille des cellules de phytoplankton (Finkel et al., 2010).

L'analyse par cytométrie en flux reprend la mesure par diffraction du laser mais combine ça à des mesures de fluorescence permettant de compter et de classer les cellules phytoplanktoniques grâce à leur signature pigmentaire et leur taille/forme (Olson et al., 1989). Les cytomètres permettent parfois de discriminer des genres ou même des espèces particulières si elles sont présentes dans le milieu avec une signature singulière et une abondance suffisante mais en général les indicateurs de diversité obtenus avec ces méthodes sont fonctionnels. Certains modèles commencent néanmoins à être équipés de caméra pouvant ainsi obtenir des photographies de chaque particule et dans le futur, couplés aux méthodes de deep learning et de réseaux de neurones (Gracs et al., 2018) cela permettra d'acquérir une diversité fonctionnelle plus proche du spécifique. Ces diverses méthodes peuvent être couplées entre elles afin d'apporter des informations supplémentaires (Font-Muñoz et al., 2018; Huo et al., 2020; Leroux et al., 2018; Thyssen et al., 2011; Wollschläger et al., 2015).

Pour sa croissance et son développement le phytoplankton nécessite quatre éléments : de l'énergie sous forme de lumière solaire, du carbone inorganique (sous forme de dioxyde de carbone ou d'ions carbonates), de l'eau et enfin de sels nutritifs (Kirk, 2010). Parmi ces sels nutritifs certains sont considérés comme majeurs : phosphore, azote, silice, sodium, soufre, manganèse, potassium, fer d'autres plus secondaires sont les éléments "traces" (Ketchum, 1954). Trois sels nutritifs peuvent être considérés comme plus importants car limitants (Reynolds, 2006) : l'azote, le phosphore et la silice. Le phosphore va notamment être impliqué dans la formation des acides nucléiques, dans celui des membranes (phospholipides) ou encore dans les processus énergétiques (ATP). L'azote est utilisée pour la synthèse des acides aminés et donc des protéines et des enzymes. La silice est un élément utilisé par un groupe particulier du phytoplankton, les diatomées. Les diatomées utilisent le Si pour la synthèse de silice biogène (bSiO₂) nécessaire à l'établissement de leur paroi silicieuse : le frustule. La consommation du phytoplankton porte essentiellement sur la part inorganique de ces éléments comme par exemple le phosphate, pour le phosphore

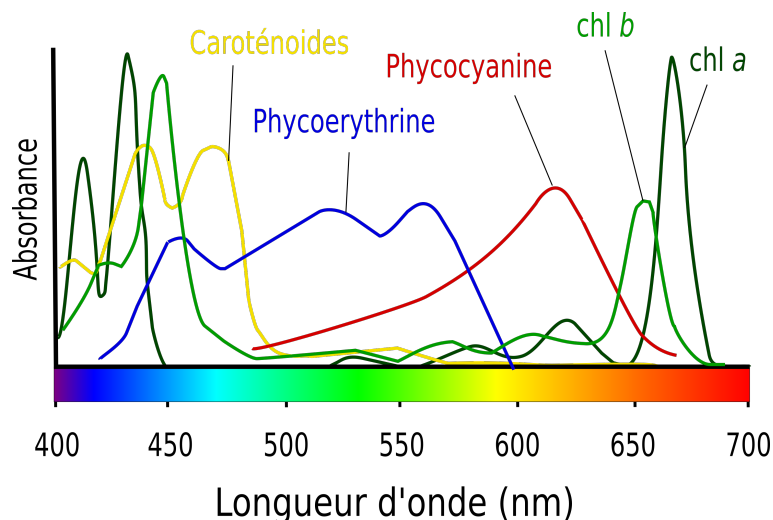


FIGURE 10 – Spectre absorption des pigments les plus usuels (Horton et al., 2005).

mais pour palier à certain manque la synthèse de molécules particulières peuvent être induite pour pouvoir transformer le phosphate organique en phosphate inorganique : c'est la phosphatase alcaline (APA). De la même manière l'urée ou des acides aminés libres peut permettre de palier à des manques de N.

Certaines espèces de phytoplancton sont aussi capables de mixotrophie (Burkholder et al., 2008; Stoecker et al., 2017) c'est à dire qu'elles vont cumuler les fonctions de photosynthèse et d'autres types de production d'énergie : la plus courante passe par la capture et la consommation de proies comme chez de nombreuses espèces de dinoflagellés.

Certaines espèces phytoplanctoniques présentent des traits les rendant "nuisibles" (Smayda, 1997) ces espèces forment des efflorescences nuisibles (HABs) Anderson et al. (2002) entraînant des conséquences sur les écosystèmes et l'homme (arrêt pêcheries, tourisme, santé humaine) (Brown et al., 2020; Heil & Muni-Morgan, 2021; Masó & Garcés, 2006). On peut séparer ces espèces en deux grands groupes en fonction du trait les rendant nuisibles : les plus connues sont les espèces dites toxiques qui produisent diverses toxines qui peuvent être des exotoxines qui impactent les organismes se trouvant à proximité ou des endotoxines qui se concentrent dans les réseaux trophiques telles que les toxines dites : diarrhéiques (DSP), paralysantes (PSP), neurotoxiques (NSP), amnésiques (ASP), ciguateriques (CFP) etc. Ces toxiques impactent directement les autres espèces ou bien la santé humaine après consommation d'espèces comestibles contaminées (Anderson et al., 2008). L'autre groupe est formé d'espèces qui ne produisent pas de toxines mais qui sont capables de former des efflorescences massives qui peuvent nuire directement à la faune marine en obstruant par exemple les branchies, mais qui entraîneront en se décomposant des demandes fortes en oxygène qui peuvent aller jusqu'à l'anoxie. En baie de Seine plusieurs de ces espèces sont répertoriées et surveillées (REPHY - réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) parmi elles, on peut citer pour les taxons toxiques la

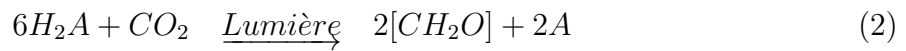
diatomée du genre *Pseudo-nitzschia*, les dinoflagellés *Karenia brevis* et *Dinophysis* et pour les espèces nuisibles non toxiques, par exemple, la dinoflagellé *Lepidodinium chlorophorum* et l'Haptophyte *Phaeocystis globosa*.

Au vu des conséquences de ces HABs dont le coût économique en Europe est estimé à 1 Md de \$ par an (Hoagland & Scatasta, 2006), notre compréhension de ces phénomènes doit être questionnée afin de mieux gérer ces problématiques. L'augmentation de l'occurrence de ces efflorescences est souvent mise en lien avec l'eutrophisation (Anderson et al., 2008, 2021, 2002; Glibert, 2017) mettant en évidence la présence de certaines espèces liées à des enrichissements au point de souligner comme Glibert en 2014 le lien entre le procédé Haber Bosch et les HABs (Glibert et al., 2014). Cependant, ce lien direct n'est pas si clair et est débattu (Davidson et al., 2012) ces efflorescences pourraient être impossible à prédire uniquement sous l'angle des sels nutritifs (Grover & Wang, 2014). Il a également été montré que les conditions dystrophiques pouvaient favoriser les HABs (Davidson et al., 2012; Wang et al., 2021) la stœchiométrie est donc un élément essentiel à prendre en considération au-delà de la concentration en sels nutritifs.

1.5 Photosynthèse

1.5.1 Généralités et structures

Pour accroître leur biomasse et se multiplier, les êtres vivants ont besoin de produire et de fixer de la matière organique. Deux grands types de production existent : la production de composés organiques en utilisant d'autres composés organiques (hétérotrophie) et par réduction minérale (autotrophie). Certaines espèces sont aussi capables de réaliser les deux (mixotrophie). Dans l'autotrophie, une partie des organismes se servent de l'énergie lumineuse pour produire leur matière organique, c'est la phototrophie (Equation. 2). Il existe deux types de phototrophie (Fenchel et al., 2012) : la photosynthèse oxygénique, la photosynthèse anoxygénique dont celle basée sur les bactériorhodopsines.



Avec H_2A un donneur d'électron externe et A est un produit oxydé.

La production primaire est le processus d'augmentation du stock de carbone organique formé à partir de la fixation de carbone inorganique, la photosynthèse qui permet cette conversion peut être définie comme la conversion biologique d'énergie lumineuse en énergie chimique stockée sous forme de composés organiques carbonés (Falkowski & Raven, 2007).

Pour mieux appréhender la photosynthèse, il faut alors définir le concept de "lumière". La lumière visible est un rayonnement électromagnétique, les quantas ou photons associés à ces ondes disposent chacun d'une longueur d'onde (λ) généralement exprimée en nm et d'une fréquence (ν). L'énergie d'un photon (ϵ) variant à l'inverse de la longueur d'onde peut alors se calculer avec la relation suivante (Equation. 3) :

$$\epsilon = h\nu = hc/\lambda = (1988/\lambda) \cdot 10^{19} \quad J \quad (3)$$

Avec h la constante de Planck (6.26×10^{-34} J s) et c la vitesse des ondes électromagnétiques dans le vide (2.9979×10^8 m. s^{-1}). Ce flux de photon peut ensuite s'intégrer avec le temps et convertit en J s^{-1} c'est à dire en Watts (W)

L'irradiance (E) représente la densité par surface du flux énergétique ($W m^{-2}$) pouvant dépendre de la longueur d'onde c'est alors l'irradiance spectrale $E(\lambda)$ ($W m^{-2} nm^{-1}$), en général on convertit en mole de photons en multipliant E par le nombre d'Avogadro (6.022×10^{23}). Le rayonnement photosynthétique actif (PAR) correspond aux longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm utilisées pour la photosynthèse, on n'y associe la densité de flux de photons photosynthétiques (PPFD). Exprimé en $\mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$ le PPFD permet de quantifier le nombre de photons PAR incidents par seconde sur une surface donnée Le PPFD représente environ 40-45 % de l'irradiance (Kirk, 1994). Les microalgues peuvent utiliser la lumière proche-UV (350-400 nm) cette partie est souvent négligée car représentant seulement 5-7 % de l'irradiance (Sakshaug et al., 1997). Au

final le PAR représente l'intégration de l'irradiance sur les longueurs d'ondes utile à la photosynthèse (Equation. 4).

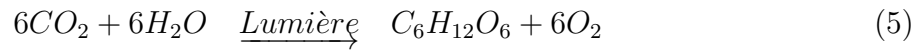
$$PPFD = (1/hc) \int_{400nm}^{700nm} E(\lambda) \cdot \lambda d\lambda \quad (4)$$

Traditionnellement le processus de photosynthèse oxygénique est simplifié à deux réactions partielles : la phase claire nécessitant de l'énergie lumineuse et la phase sombre. Ces réactions peuvent être précisées, décrivant alors quatre phases ou les trois première décrivent la phase "claire" Blankenship (2013) et seule la première phase nécessite de la lumière : absorption de lumière par les antennes (1), transfert d'électrons dans les centres réactionnels (2), stabilisation de l'énergie et processus secondaire (3) et synthèse et export de produit stable (4).

Pour les eucaryotes photosynthétiques, le processus de photosynthèse se réalise dans les chloroplastes (Fig. 11.A). À l'intérieur de cet organite possédant 2 à 4 membranes en fonction de la lignée (McFadden, 2001). Les thylakoides qui sont le véritable siège des processus photosynthétiques que l'on trouve également chez les cyanobactéries. Chez les algues vertes et les végétaux supérieurs, les thylakoides sont empilés pour former des grana alors qu'ils seront regroupés par exemple par trois chez les diatomées et les dinoflagellés et par deux chez les cryptophytes (Fig. 11.B). C'est sur la membrane des thylakoides que se trouve les antennes collectrices (LHC) formées par différents types de pigments et de protéines en fonction des lignées (Larkum, 2016).

Dans un premier temps, la lumière est récupérée par des antennes collectrices des pigments disposés sur la membrane des thylakoides, ces antennes ne font pas de photochimie et servent à concentrer l'énergie via transfert d'état excité jusqu'à un centre réactionnel, en fonction des espèces, on peut avoir de quelques antennes associées à un centre réactionnel à des milliers (Blankenship, 2013). La taille et le nombre de ces antennes peut aussi varier inversement à l'intensité lumineuse (photoacclimatation). La seconde phase a lieu dans le centre réactionnel : au centre où se trouve le premier accepteur d'électron de la chaîne de transfert de la photosynthèse. C'est la molécule de chl *a* P680 qui va être le premier donneur d'électrons pour le photosystème II (PSII). La P680 va ensuite donner l'électron au premier accepteur, la quinone A (Q_A) qui va alors se réduire ce qui correspond à la fermeture du centre réactionnel. Il y a ensuite le second accepteur la quinone b (Q_B) qui va se réduire entraînant la ré-ouverture du centre réactionnel, l'électron passera ensuite par les plastoquinone (PQ). Cette chaîne d'électrons qui se succède dans Le PSII et le PSI correspond à la troisième phase. Dans le PSII les électrons issus de l'oxydation de l'eau sont amenés jusqu'au PSI (P700) où ils serviront à réduire un accepteur d'électron et à former du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit). En parallèle, les protons issus de l'eau vont eux servir à synthétiser de l'ATP (Adénosine triphosphate) via un gradient de protons permettant de faire fonctionner l'ATP synthase. Ainsi la phase dite "claire" de la photosynthèse permet de produire des réducteurs (le NADPH) et de

l'énergie (l'ATP). De nombreuses voies alternatives des électrons entre le PSII et PSI vont permettre de modifier les rapports NADPH et ATP et sont également impliquées dans d'autres métabolismes tels que ceux de l'azote ou du soufre. Lors de la phase dite "obscur", le NADPH et l'ATP vont permettre de réduire le carbone inorganique en sucre via le cycle de Calvin-Benson (Sharkey, 2019) et d'une enzyme particulière la RubisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase). Ces réactions peuvent se synthétiser dans l'équation suivante (Equation. 5) :



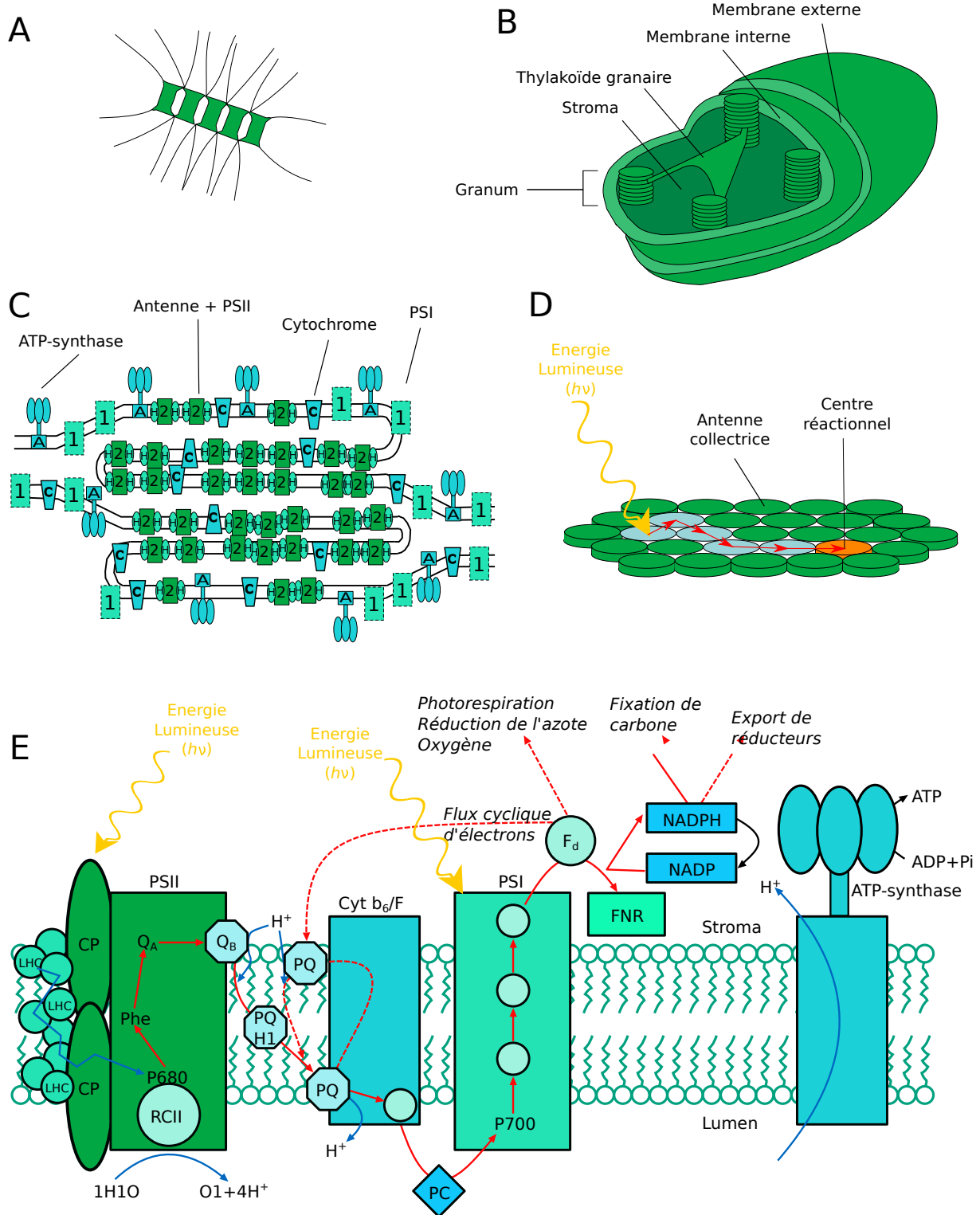


FIGURE 11 – Organisation de l'appareil photosynthétique : *Chaetoceros sp.* (diatomée) (A), Chloroplaste de chlorobiontes (Taiz & Zeiger, 2010) (B), Disposition hétérogène des complexes sur la membrane des thylakoides (Allen & Forsberg, 2001) (C) Diagramme d'une unité photosynthétique (Garrett & Grisham, 2016) (D) Schéma représentant le transport des électrons à travers les photosystèmes de Huot & Babin (2010) modifié par Vivier (2021) (E).

1.5.2 Absorption & fluorescence

Lorsque la lumière est captée par les antennes réceptrices, l'énergie du photon est alors transmise par résonance au pigment le plus proche et ça jusqu'à arriver à un centre réactionnel. À ce moment l'énergie de ce photon va être absorbée par un pigment photosynthétique ce qui va faire passer la molécule dans un état excité, l'énergie peut alors être transformée de diverses manières :

1. Transfert dans la chaîne énergétique : l'énergie va être transmise au PSII puis à la Q_A , c'est la photochimie.
2. Transfert par résonance : l'énergie va être transmise sans perte à un pigment proche via résonance, bien que l'énergie ne soit pas perdue.
3. Perte de l'énergie par chaleur : l'énergie va être dissipée sous forme de chaleur, c'est l'extinction non photochimique (*non photochemical quenching* - NPQ).
4. Perte de l'énergie par lumière : un photon de lumière va être réémis alors que le pigment excité redescend dans un état d'excitation inférieur : c'est la fluorescence.

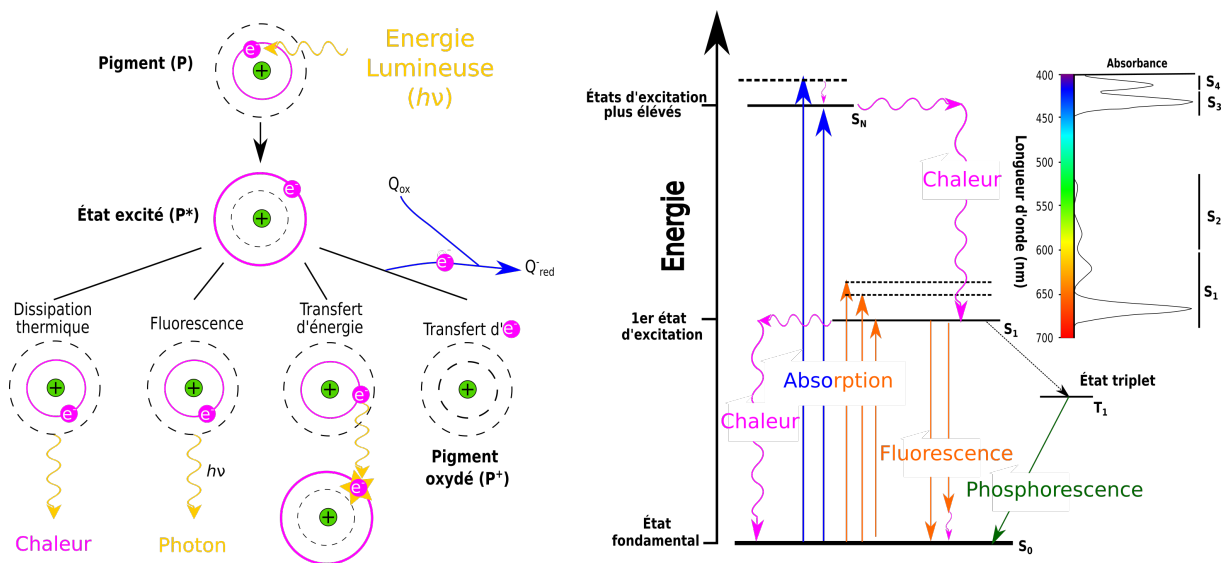


FIGURE 12 – Voies possibles d'un quantum de lumière absorbé par un pigment (P) (Garrett & Grisham, 2016) (Gauche), Diagramme énergétique des états d'excitation et des voies de dés-excitation de la chl a (Droite) (Demers, 2011; Suggett et al., 2010).

La fluorescence est donc une réémission d'énergie lumineuse après excitation d'un pigment (Maxwell & Johnson, 2000). Le pigment universel de la photosynthèse oxygénique, la chl a , a deux pics d'absorption un vers les 436 nm (bleu, bande de Soret) et un pic vers les 680-700 nm (rouge). Cette fluorescence est à température normale (autre que 77 K) est issue essentiellement de la chl a des PSII (Barber et al., 1989; Krause & Weis, 1991).

Pour un taux d'énergie utilisé pour la photochimie (k_p), il y a un taux pour les pertes liées au transfert par résonance (k_s), à la dissipation de chaleur (k_h) et à la fluorescence (k_f). L'efficacité de la conversion énergétique au niveau du PSII peut se décrire comme la proportion utilisée par la biochimie divisée par toute l'énergie arrivant correspondant à la somme des proportions énoncées avant (Equation 6). Ce taux de conversion est le quantum d'efficacité de photochimie du PSII (ϕ_{PSII}).

$$\phi_{PSII} = k_p / (k_p + k_s + k_h + k_f) \quad (6)$$

Le processus de production primaire étant un élément majeur des systèmes aquatiques, de multiples méthodes de mesure permettent de mesurer la photosynthèse et donc la production primaire. Des méthodes directes sont disponibles : les méthodes utilisant des isotopes du carbone ou de l'oxygène, (Glibert et al., 2019). On peut ainsi mesurer la quantité de C fixé, à partir de l'isotopique radioactif (^{14}C) par la méthode de Steeman-Nielson (1952) modernisée par la suite par Babin et al. (1994), ou à partir de l'isotope stable ^{13}C (Slawyk et al., 1977) qui est moins sensible que le ^{14}C mais plus facile à mettre en oeuvre. Pour l'oxygène, on peut utiliser des méthodes utilisant des enrichissements en ^{18}O (Bender et al., 1987) ou la méthode des trois isotopes ($^{16}O_2, ^{17}O_2, ^{18}O_2$) (Luz & Barkan, 2000).

Mais ces méthodes sont coûteuses en consommable, en temps d'analyses et elles nécessitent souvent des incubations longues qui peuvent dériver à cause du confinement et subir des modifications. Pour palier à ces biais et problèmes, d'autres méthodes ont été mises en place en se basant sur les propriétés de fluorescence de la chl *a* in vivo. L'effet "Kautsky" (Kautsky & Hirsch, 1931; Lichtenthaler, 1992) est la première méthode venant exploiter la fluorimétrie pour estimer des paramètres photosynthétiques via l'analyse de la relation entre les flux d'électrons au niveau du PSII et l'augmentation rapide (jusqu'à deux secondes) de l'intensité de la fluorescence appelée courbe "OJIP" (Stirbet & Govindjee, 2011). La fluorimétrie active va ensuite se développer (Schreiber & Bilger, 1993; Schreiber et al., 1995a,b, 1986) via les fluorimètres PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) développé par la société WALZ (Allemagne) et les modèles de type fluorimètre FRRf (Fast Repetition Rate fluorimeter) (Kolber et al., 1988) utilisant des flashes de saturation rapide (Mauzerall, 1976) développés par plusieurs fabricants. Récemment, une dernière génération de fluorimètre variable à single turnover (STAF) a été développée par la société Chelsea Technologies qui permet d'augmenter la sensibilité et la précision des mesures en intégrant des corrections telle que celle du *package effect* (Boatman et al., 2019). Ces méthodes diffèrent par la façon de saturer le PSII. Après une période au noir le stock de premier accepteur d'électrons (Q_A) est oxydé, le centre réactionnel peut donc accueillir de l'énergie il est "ouvert". Une fois que l'énergie lumineuse est acceptée par le pigment (P_{680}) la Q_A se réduit et le centre se ferme le temps que l'électron soit transmis au second accepteur la quinone B (Q_B) et puisse se rouvrir et re-accepter de l'énergie lumineuse.

Lors des saturations single turnover (ST) par les flashes des FRRf ou du STAF ce cycle de réduction-oxydation de la Q_A ne se produit qu'une fois, alors que pour les saturations multi turnover (MT) du PAM ce cycle va se faire plusieurs fois lors du flash dont la durée est beaucoup plus longue (Kolber & Falkowski, 1993). Ces méthodes de fluorimétrie variables du PSII permettent de calculer des paramètres photosynthétiques qui permettront de faire des estimations de production primaire directes non invasives et à haute fréquence temporelle (Hughes, 2018; Napoléon, 2012).

1.5.3 Régulation de la production primaire

De nombreux paramètres biotiques et abiotiques peuvent affecter la fonction de production primaire. Dans les milieux eutrophisés deux variables en particulier sont considérées comme majeurs : la lumière et les nutriments (Dokulil, 2014).

Les intensités de lumière vont varier sur plusieurs échelles temporelles : des variations de cycles climatiques aux variations dues aux mouvements des nuages, des vagues, ou à de la turbulence dans la colonne d'eau avec la variation majeure qui est le cycle journalier (Falkowski, 1984). Les cellules peuvent être exposées à des intensités soudaines et très élevées, mais l'utilisation de l'énergie lumineuse est limitée de manière biochimique (Matsubara et al., 2016). Cette limitation vient de l'écart entre la capacité d'absorption et de transfert d'énergie, qui peut être associée à un manque d'intermédiaire du cycle de Calvin-Benson, ou un bas état d'activation de la RubisCO (Pearcy, 1990). La lumière absorbée en excès peut conduire à la photoinhibition, c'est à dire une baisse dans l'efficacité photosynthétique pouvant aller jusqu'à altération des photosystèmes. Cette photoinhibition provient de la production de dérivé réactif de l'oxygène (ROS) (Asada, 1999; Niyogi et al., 1998) endommageant l'appareil photosynthétique comme le PSII (Powles, 1984). Cet excès de lumière doit donc être limité pour éviter ces conséquences. Pour cela, les mécanismes de photoprotectons vont permettre de s'acclimater à ces variations de lumière (Dubinsky & Stambler, 2009). Plusieurs méthodes de photoprotection existent comme tout simplement de se déplacer pour des cellules motiles afin de se placer à des intensités plus supportables (Raven, 2011). Mais de la même manière que l'intensité lumineuse ces mécanismes se répartissent sur des ordres de grandeur allant de quelques millisecondes comme le cycles des xanthophylles à plusieurs heures ou jours comme la modification du quota de chl *a* intracellulaire (MacIntyre et al., 2000). On peut séparer ces mécanismes selon ces ordres de grandeur : long terme (acclimatation) et court terme (régulation), pour le court terme, il va falloir réguler l'absorption d'énergie pour éviter les excès (Ruban, 2016). Les protéines LHII vont en réponse à un signal (le ΔpH des thylakoides) avoir une boucle de rétrocontrôle (Horton & Ruban, 2005). Ce sont les mécanismes d'extinction non-photochimique (*Non-Photochemical Quenching*, NPQ) qui vont dissiper l'état d'excitation de la chl *a* ayant absorbé un photon par la dissipation en chaleur (Müller et al., 2001). Ce terme s'oppose au quenching photochimique (qP) ou l'énergie est utilisée pour

les réactions photosynthétiques. Néanmoins il faut prendre en compte le coût énergétique de ces mécanismes de photoprotection (Raven, 2011).

Des acclimations existent aussi afin d'optimiser l'absorption de la lumière en fonction de l'intensité : variation de la concentration en chl *a* et des pigments ou de leur organisation, du nombre de photosystèmes, de la taille des antennes. Ces changements modifient l'absorption de lumière et entraînent potentiellement un auto-ombrage à l'intérieur du chloroplaste entre les structures d'absorption c'est le mécanisme de *package effect* (Fujiki & Taguchi, 2002). Ainsi, une lumière émise en fluorescence par un pigment peut être réabsorbée par un autre, en fonction de l'importance de ce *package effect*, la proportion totale de fluorescence émise par une cellule va donc baisser dû à ces réabsorptions (Fig. 13). À plus grande intensité de lumière un important *package effect* devient moins optimal, plus il y a de chlorophylle, plus il y a de membranes de thylakoïde, et par auto-ombrage plus la section d'absorption optique (a^*) diminue (Berner et al., 1989). Néanmoins le *package effect* via l'auto-ombrage peut jouer un rôle dans la photoprotection (Barros et al., 2003).

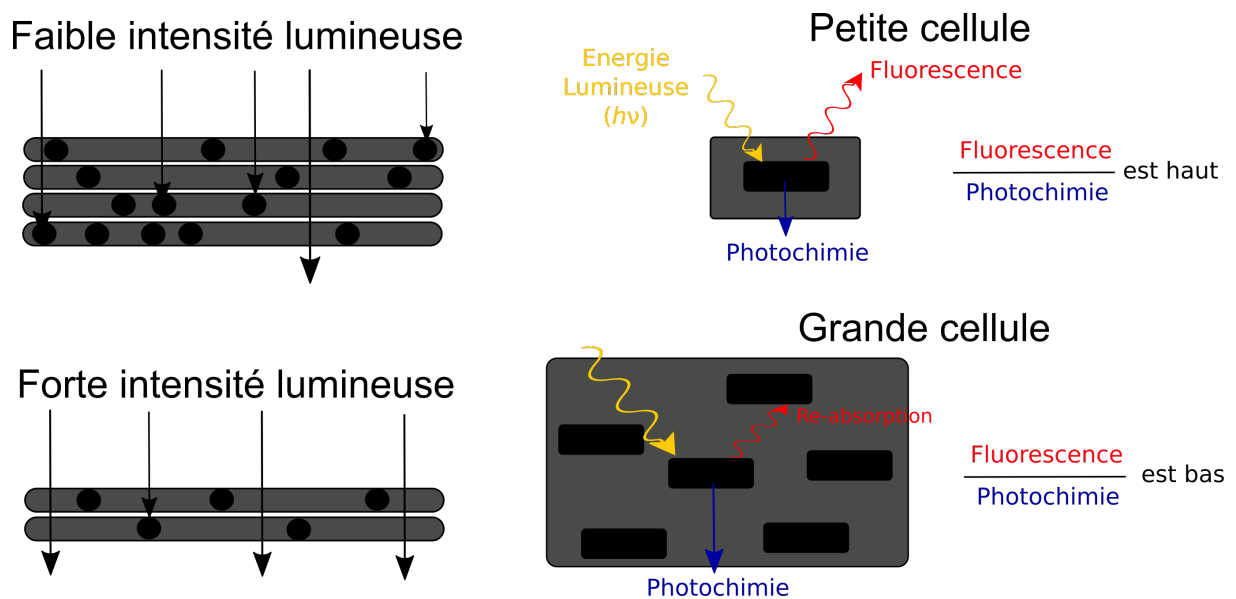


FIGURE 13 – *Package effect* : Schéma décrivant le mécanisme d'auto ombrage (Falkowski & Raven, 2007) (Gauche). Schéma de l'effet de la variation de la taille de cellule sur le mécanisme de ré-absorption et le ratio Fluorescence/photochimie (Droite).

D'une manière générale, les limitations en nutriments vont réduire la capacité à fixer du carbone et donc réduire la production primaire. Mais les limitations en nutriments vont aussi affecter les capacités photosynthétiques (Behrenfeld et al., 2004; Claquin et al., 2010; Mangoni et al., 2009, 2017; Napoléon et al., 2013). Plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu : dégradation des phycobilisomes chez les cyanobactéries (Raven & Geider, 2003), manque de ressource pour la synthèse de catalyseur (Raven & Geider, 2003), les limitations en N résultent en un manque pour la production de protéine nécessaire aux

centres réactionnels (Kolber et al., 1988), affecter le nombre d'électrons requis pour fixer une mole de carbone (Babin et al., 1996; Napoléon et al., 2013). Le rendement quantique maximum du PSII (F_v/F_m) est d'ailleurs utilisé pour mesurer un stress lié aux limitations en nutriments (Parkhill et al., 2001).

D'autres facteurs peuvent affecter les capacités photosynthétiques : la température (Claquin et al., 2008) est un des principaux mais aussi les UV (Cabrerizo et al., 2014), le pH (Gerloff-Elias et al., 2005), la prédation (Xu et al., 2021) ou lyse virale (Kimmance et al., 2014).

Aussi il faut prendre en compte que ces facteurs de régulation sont soumis à une grande variabilité liée à la diversité phylogénétique. Que ce soit le NPQ (Goss & Lepetit, 2015), le package effect (Ferreira et al., 2017) ou l'adaptation aux limitations en nutriments ce qui peut rendre difficile de discerner quels facteurs affectent les capacités photosynthétiques (Almazán-Becerril & García-Mendoza, 2008) car certaines espèces peuvent s'adapter à des basses concentrations et des conditions limitantes (Sun et al., 2019).

1.6 Contexte & Problématique

Le continuum estuaire-baie de la Seine présente une stoechiométrie des sels nutritifs fortement modifiés par l'anthropisation et qui montrent d'important rapport N:P accentués par la baisse des apports de phosphates, ce qui a provoqué une baisse de la biomasse depuis plusieurs années. D'autres paramètres environnementaux tels-que la baisse des débits de la Seine et l'augmentation de la température sont également observés.

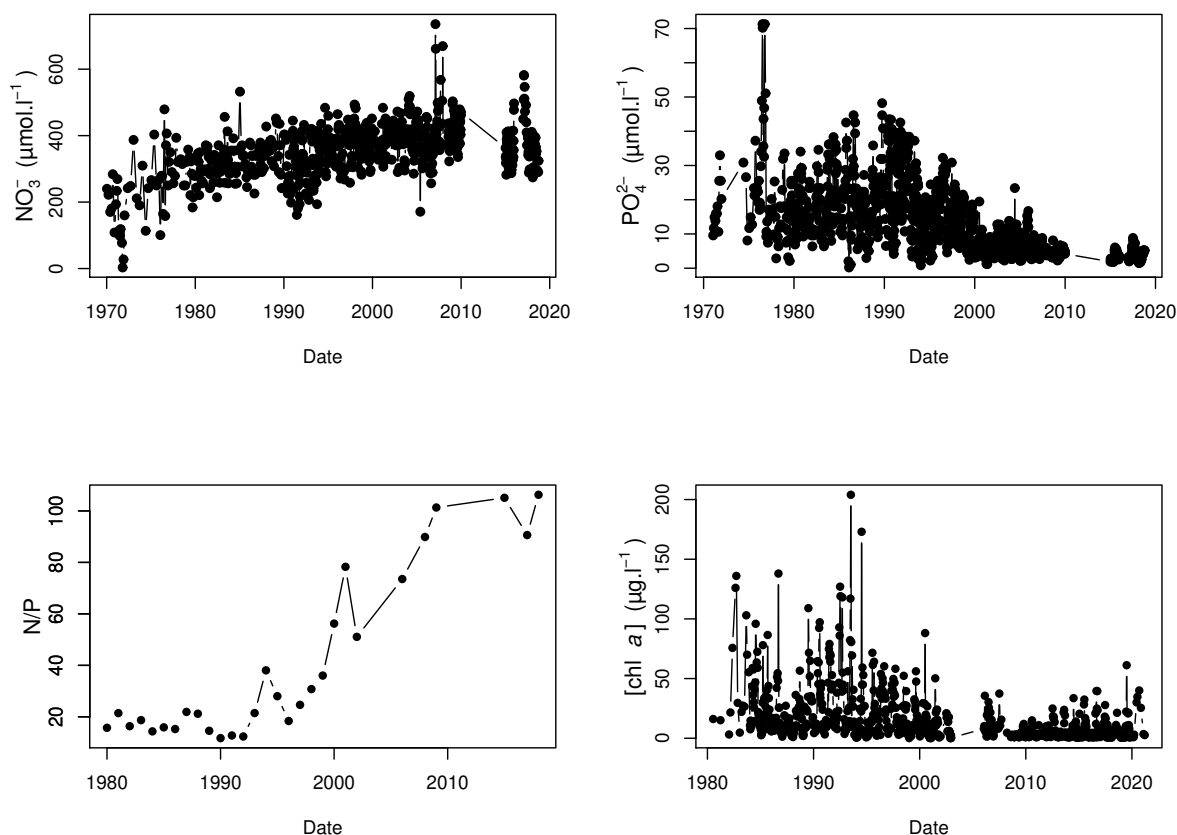


FIGURE 14 – Trajectoires historiques de l'Estuaire de Seine mesurées à Duclair (pK = 278) : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl *a* concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

Ce sont les réseaux de surveillance qui permettent de suivre cette évolution : le service d'observation en milieu littoral (SOMLIT) crée en 1996 permet de caractériser l'évolution à l'échelle pluri-décennale des écosystèmes côtiers permettant ainsi de mesurer les changements anthropiques et climatiques et possède un point de mesure à Luc-sur-Mer depuis 2007. Le réseau d'observation du phytoplancton (PHYTOBS) combine les analyses du SOMLIT et du REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) afin d'analyser les communautés phytoplanctoniques et d'évaluer l'état des systèmes à l'aide d'indicateur. Le réseau système d'observation pour l'océan côtier à hautes fréquences

(COAST-HF), utilise les mesures à hautes fréquences temporelles (10 - 20 minutes pour les paramètres physico-chimiques) pour améliorer la compréhension du fonctionnement des écosystèmes côtiers à échelle multiple. La bouée SMILE installé au large de Luc-sur-mer mesure un grand nombre de paramètre depuis 2016.

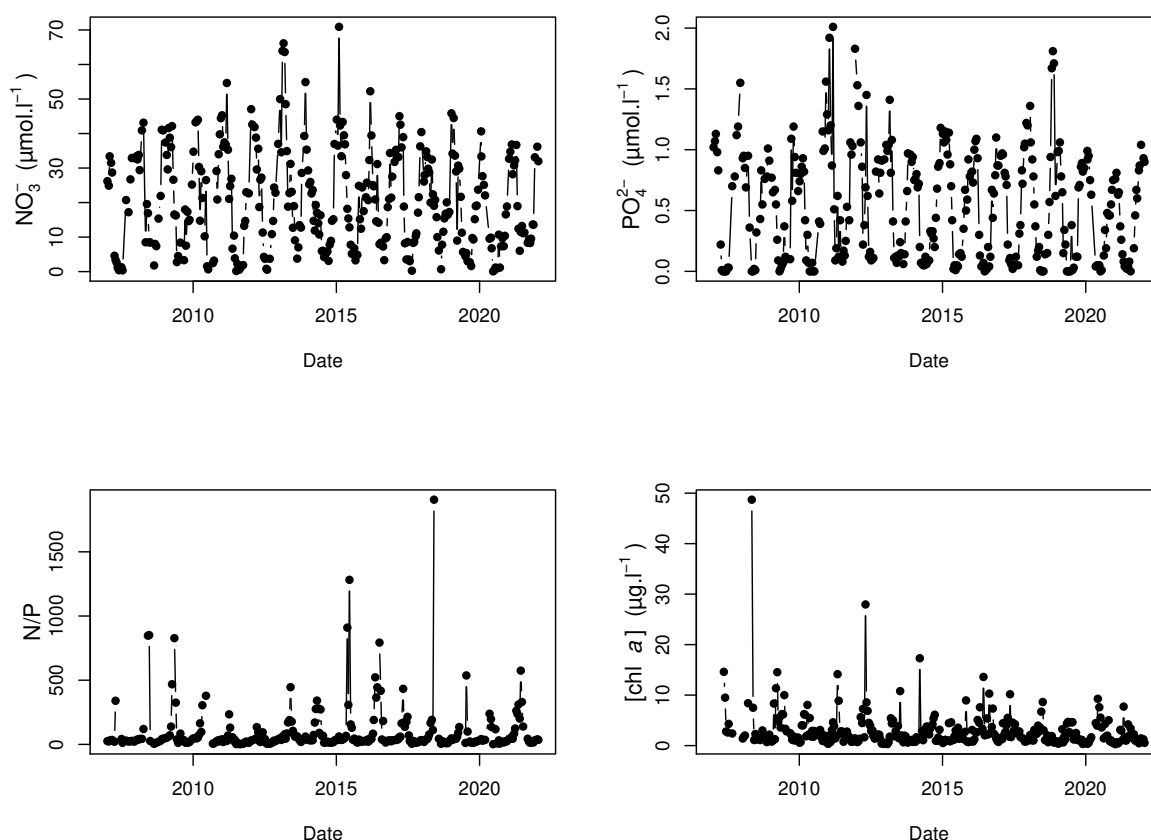


FIGURE 15 – Trajectoires historiques de la Baie de Seine mesurées à Luc-sur-mer : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl *a* concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

Le continuum baie estuaire a un intérêt écologique et socio-économique majeur. Or les modifications de l'environnement peuvent altérer des grandes fonctions de l'écosystème comme la production primaire en influençant la le compartiment phytoplanctonique au niveau de sa structure, de sa dynamique (occurrences des efflorescences), de sa productivité (photosynthèse), de sa croissance, de ses excréations etc. Appréhender ces mécanismes et les conséquences de l'eutrophisation et ou de la dystrophie impose de travailler à différentes échelles qu'elles soient spatiales temporelles ou biologiques (Fig. 16).

Pour étudier ces processus le projet PLEASE (Production primaire & Dynamique phytoplanctonique en baie de Seine le long du gradient d'eutrophisation) supporté par l'Agence de l'eau Seine Normandie et la Région Normandie (thèse co-financée) s'appuie

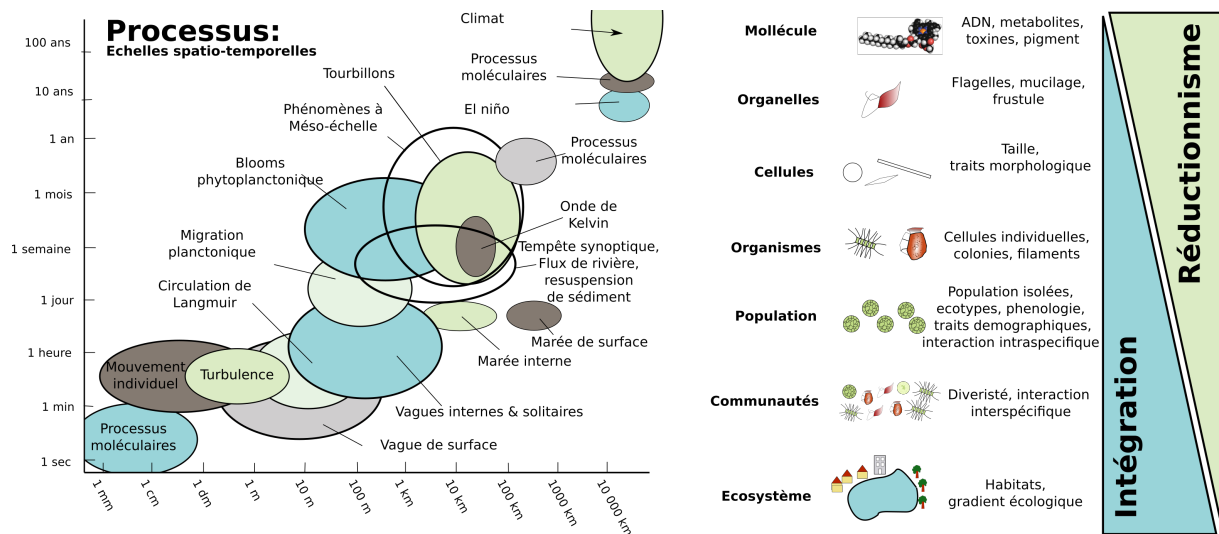


FIGURE 16 – Dimension et échelle : Échelles spatiale et temporelle des processus marins (Dickey, 2003) (Gauche), Dimensions biologique et écologique de l'écologie du phytoplancton (Salmaso et al., 2015) (Droite).

sur - les données produites par bouée instrumentée (SMILE) (Système de Mesure Instrumenté Littoral, pour l'Environnement) qui mesure différents paramètres hydrobiologiques dont la photosynthèse et les sels nutritifs à haute fréquence temporelle ; - sur les données basses fréquences du SNO SOMLIT, sur des campagnes dédiées en baie de Seine le long de transect ou à des points fixes ; - sur le projet SARTRE (GIP Seine Aval) pour les campagnes réalisées entre Honfleur et Rouen de 2019 à 2021. En parallèle des mesures *in situ*, des expériences en milieu contrôlé en microcosme permettent de mimer des processus du milieu naturel tout en manipulant librement les quantités et les rapports des nutriments.

Les objectifs de la thèse sont donc de :

1. Qualifier l'effet des sels nutritifs et de la dystrophie en particulier N:P sur la production primaire via des mesures de photosynthèses couplant différentes approches et sur la structure des communautés du phytoplancton en appliquant différents indicateurs de diversité (spécifique, fonctionnelle).
2. Explorer le lien entre la biodiversité du phytoplancton et la production primaire dans le contexte de dystrophie.
3. Identifier des indicateurs adaptés à la problématique d'eutrophisation et de dystrophie pour le suivi de l'écosystème pouvant se généraliser à d'autres sites d'étude.

Chapitre 2

Étude d'un cas d'efflorescence de
Lepidodinium chlorophorum en Baie
de Seine.

2.1 Résumé

Les efflorescences sont des évènements peu prévisibles, ne durant souvent que quelques jours et donc complexes à étudier. La bouée instrumentée SMILE a néanmoins permis de mesurer l'entière durée d'une efflorescence de six jours dominée par un dinoflagellé récurrent de la baie de Seine : *Lepidodinium chlorophorum*. La bouée est équipée d'une grande gamme de capteurs mesurant des paramètres physiques, biologiques et chimiques tels que la photosynthèse et les sels nutritifs (OPUS & WIZ). L'alerte de l'efflorescence déclenchée via la bouée a permis de mener une expérience d'enrichissement en milieu contrôlé en parallèle sur de l'eau provenant de l'efflorescence. L'effet de l'apport en nutriments sur la communauté phytoplanctonique présente a ainsi été testé. Cinq enrichissements (témoin, N, P, N+Si and N+P+Si) ont été appliqués à l'eau prélevée au niveau de la bouée SMILE. Après 4 jours des mesures de $chl\ a$, de la structure de communautés, de paramètres photosynthétiques, d'APA, de TEP et de sels nutritifs ont été réalisés.

Les mesures à haute fréquence produites par la bouée mettent en évidence l'effet d'un apport d'eau douce dans le déclenchement de l'efflorescence. L'apport d'une eau plus chaude, avec une salinité plus faible et enrichie en sels nutritifs a permis le développement de l'efflorescence. La sénescence de l'efflorescence semble induite par une forte chute en P entraînant une augmentation du rapport N:P qui précède la baisse de la biomasse. Cette chute de P coïncide avec une baisse du statut physiologique (F_v/F_m) et de la production maximale ($JV_{II_{max}}$) phytoplanctonique.

Les enrichissements réalisés permettent d'explorer la dynamique des communautés et des paramètres physiologiques en détail. La population de *L. chlorophorum* s'est maintenue et a continué à croître dans les enrichissements comprenant à la fois du N et du P. Tous les groupes phytoplanctoniques discriminés à l'aide de la cytométrie semblent profiter de cet enrichissement à l'exception de *Synechococcus*. Dans les autres enrichissements (témoin, N, P et N+Si) la croissance, la production et le statut physiologique sont réduits. Pour les conditions montrant un déséquilibre N:P, une augmentation de l'APA et des TEP a été observée. Cependant comme dans le cas de l'efflorescence, la population ayant été enrichie en N & P présente une productivité plus faible que les autres enrichissements. Cette baisse de la productivité peut être liée à une baisse de l'absorption fonctionnelle (σ_{PSII}) due à des mécanismes d'auto-ombrage.

L. chlorophorum est connu pour sa capacité à produire des TEP en grande quantité. Dans un cas d'efflorescence massive suivi par un déséquilibre des apports N:P causé par la consommation des communautés de l'efflorescence, l'augmentation de la production de TEP pourrait amplifier les conséquences de l'efflorescence sur l'écosystème en favorisant le développement des bactéries hétérotrophes et la sédimentation massive des cellules, ce qui pourrait augmenter la consommation locale d'oxygène. La compréhension de ces événements extrêmes permettent de mieux appréhender la problématique d'eutrophisation tant sur les facteurs de contrôle que sur le devenir des efflorescences.

Coupling High frequency monitoring and bioassay experiments to investigate a Harmful algal bloom in the Bay of Seine (French-English Channel)

Léon Serre-Fredj^{a,b}, Franck Jacqueline^c, Maxime Navon^{a,b}, Guillaume Izabel^{a,d}, Léo Chasselin^{a,d}, Orianne Jolly^{a,d}, Michel Repecaud^c, Pascal Claquin^{a,b*}

1. Normandie Université, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
2. Unité Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, FRE 2030), Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France
3. Ifremer LER/N, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port-en-Bessin, France
4. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine de l'Université de Caen Normandie, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530

*Corresponding Author

Pascal Claquin

Email : pascal.claquin@unicaen.fr

Address : BOREA Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques, FRE 2030 MNHN CNRS SU UA UCN IRD 207, Université de Caen Normandie, Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France

Abstract

Coastal ecosystems are increasingly threatened by eutrophication and dystrophy. In this context, the full pattern of a bloom dominated by the dinoflagellate, *Lepidodinium chlorophorum*, was investigated by a high frequency monitoring buoy equipped with sensors allowing nutrients and photosynthesis measurements. An increase of the N:P ratio affected phytoplankton physiology leading to bloom collapse with a slight oxygen depletion. In parallel, enrichment experiments were performed on the natural bloom population. After 5 days of incubation the community structure, using flow cytometry and several physiological parameters were analysed. The data reveal a potential N and P co-limitation and a decoupling between primary production and productivity in fully enriched conditions. Under unbalanced N:P inputs, high level of alkaline phosphatase activity and transparent exopolymeric particle production, which favour phytoplankton sedimentation, were observed. Nutrient inputs and their stoichiometry control phytoplankton growth, the community structure, physiological regulations, the fate of the bloom and consequences.

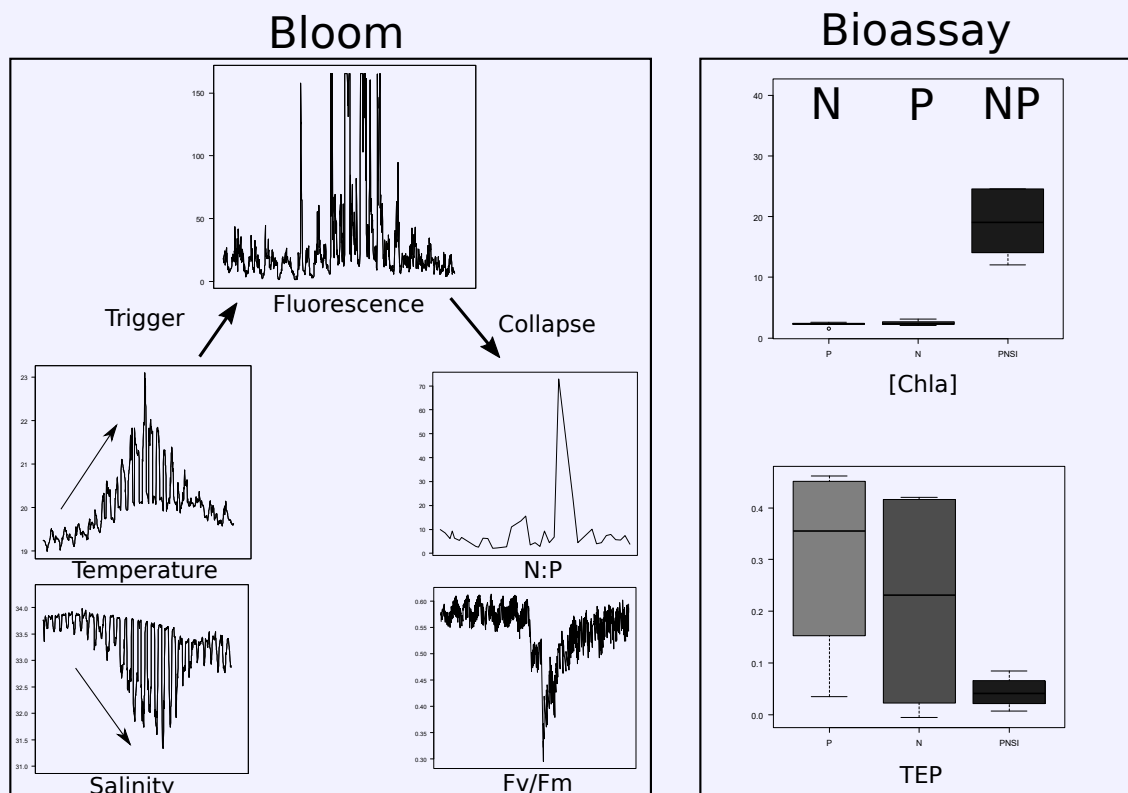


FIGURE 17 – Graphical Abstract

2.2 Introduction

As the ocean's first frontier, coastal ecosystems are increasingly under threats that affect many essential benthic and pelagic habitats of marine species (Barbier et al., 2011). Eutrophication, which is due to excess nutrient inputs in coastal systems caused by human activities is one of the major environmental problems affecting coastal ecosystem in the world (Rabalais et al., 2009). These inputs affect both the concentration of nutrients and their stoichiometry (Martin et al., 2008; Watanabe et al., 2017). The growth and diversity of primary producers, like phytoplankton, which are at the base of the marine food web, are largely controlled by these inputs (Smith et al., 2006). Unbalanced nutrient inputs and dystrophy, both frequently linked with eutrophication, have several effects on phytoplankton : modification of communities (Leruste et al., 2019; Shen, 2001), alter the growth rate (Nwankwegu et al., 2020), produce allochemical-like toxins which, in turn, favour monospecific blooms (Granéli et al., 2008). Associated with other environmental parameters including light, temperature, water mass residence time, or river discharges, nutrient inputs can lead to phytoplankton blooms (Heisler et al., 2008) that may be classified as harmful algal blooms (HAB) (Anderson et al., 2008). HAB species are usually split into two groups, one of which is able to produce toxins or harmful metabolites that damage wildlife, or result in poisoning of human seafood, and the second in which high densities of non-toxic cells can harm the environment by producing scums or foams which lead to oxygen depletion (Anderson et al., 2002).

Nutrient inputs into the Bay of Seine (France) are mainly controlled by inputs from the Seine River (Aminot et al., 1998) although smaller rivers inputs also have local impacts (Lemesle et al., 2015). Over the last decades, many programmes for the management of nutrient inputs have reduced nutrient discharges but have mainly had an impact on phosphorus inputs, whereas N inputs remain high (Garnier et al., 2019). The stoichiometry of nutrient inputs have been broadly modified over the last decade and very high N:P ratio inputs are regularly measured in the Seine River and Seine estuary (Meybeck et al., 2018).

Although chlorophyll biomass has decreased in recent years in the English Channel (Gohin et al., 2019), the relative proportion of the dinoflagellate group has increased (Hernández-Fariñas et al., 2014; Widdicombe et al., 2010). In the Bay of Seine, several species of dinoflagellate like *Karenia mikimotoi* and *Lepidodinium chlorophorum* are able to form large harmful algal bloom (HAB) (Napoléon et al., 2014). *Lepidodinium chlorophorum* is known to produce large quantities of transparent exopolymeric particles (TEP) (Claquin et al., 2008) and to be responsible for the mortality of marine organisms due to oxygen depletion induced by decomposition of the population (Sournia et al., 1992)).

Many studies have shown that phytoplankton communities can respond within a few hours after an environmental change (Lefort & Gasol, 2014; Thyssen et al., 2008) which stresses out the necessity of implementing a high frequency sampling (Bouman et al., 2005). In the present work, a late summer *L. chlorophorum* bloom event was studied in detail using high frequency measurements made by an instrumented buoy called SMILE (0° 19.68', 49° 21.23'). In addition to standard sensors (temperature, salinity, turbidity, oxygen, light and fluorescence), the SMILE buoy is equipped with a fast repetition rate fluorimeter (FRRf), which enables photobiological and physiological measurements of the phytoplankton communities, and two types of nutrient sensors, which together provide new and more realistic pictures of bloom dynamics.

In addition to monitoring the bloom event, enrichment bioassay experiments were performed on samples collected during the bloom in order to understand how nutrient inputs influence the structure and physiological parameters of the communities. The specific objectives of our studies were to :

1. Characterise bloom dynamics from an original point of view by including physiological, productivity, and nutrients measurements at a high frequency.
2. investigate phytoplankton dynamics and the ecophysiology of a community dominated by *L. chlorophorum* as a function of nutrient inputs.

2.3 Material and Methods

2.3.1 High frequency measurements using an instrumented buoy

The bloom event was monitored *in situ* using the SMILE buoy in the Bay of Seine (Fig. 18) measuring since 2016 which belong the COAST-HF network (French Coastal ocean observing system - High frequency). Different types of measurements were performed at different frequencies by the buoy.

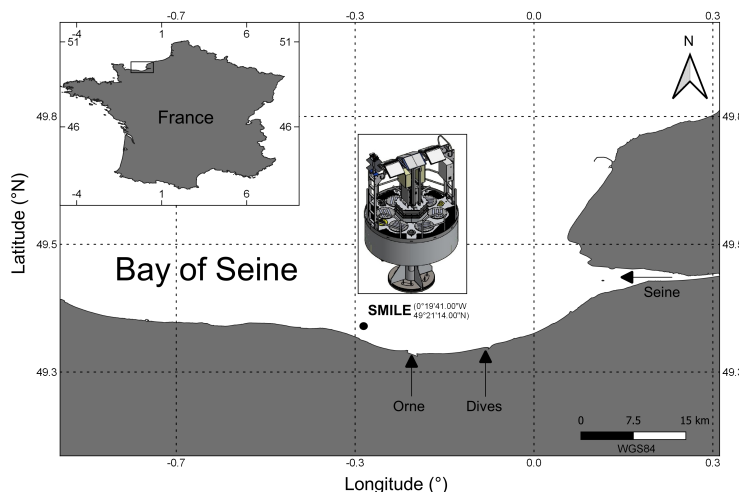


FIGURE 18 – Location of the Bay of Seine (France), local rivers are illustrated by arrow with their name.

2.3.1.1 List of measurements performed at high frequency by the buoy

Conductivity and temperature (tetracon sensor, WTWTM, Germany), turbidity (Seapoint turbidity meter, Seapoint Sensor, USA), oxygen (AADI Oxygen optode, Aanderraa, Norway) and in-vivo fluorescence (Cyclops-6K, Turner Design, USA) sensors that measure fluorescent in fluorescein in fluorescent units (FFU) are grouped in a multiparameter probe NKE instrument (MP7, NKE Instrumentation[®], France), PAR (Photosynthetically active radiation) is measured with a Satlantics sensor (Satlantics, Italy). All these parameters were measured at 20-min intervals (data available : doi.org/10.17882/53689). Photosynthetic parameters were determined at 2-h intervals using the FastOcean FRRf3 sensor with the Act2 system (Chelsea Technologies, UK) with an excitation light provided by a blue light-emitting diode (450 nm). Inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_3 , NO_2^-) were measured by the chemical probe Wiz (SYSTE A S.p.A, Italy) once a day while an optical sensor, OPUS (Trios, Germany), also measured NO_3^- at 20-min intervals. All measurements were performed at one-meter depth.

2.3.1.2 High-frequency measurements of inorganic nutrients

The Wiz probe uses micro loop flow analysis (μ LFA) for autonomous measurements of four nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , NO_2^-) using colourimetric methods and NH_3 with a fluorimetric method (Azzaro, 2014; Moschetta et al., 2009). As the buoy has limited energy, measurements were only performed once a day. The detection limits were $0.35 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for NO_3^- and $9.2 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.l}^{-1}$ for PO_4^{3-} . NO_3^- was also measured using an optical sensor (OPUS, Trios, Germany). The OPUS UV is a spectral sensor equipped with a xenon flash lamp as light source and a high-end miniature spectrometer (MMS, Zeiss, Germany) with 256 channels covering the spectral range from 200 to 360 nm as detector. This sensor measures NO_3^- at high frequency with low energy consumption. A 20-mm optical path allowed measurements from 1 to $357 \mu\text{mol.l}^{-1}$ with a precision of $0.18 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

2.3.1.3 High frequency photosynthetic measurements

FLCs (fluorescent light curve) were measured *in situ* by the buoy using a FRRf-ACT2. The samples were analysed after a 5 min period of dark incubation for the oxidation of the Quinone A (Q_A). At the end of the dark period F_o (minimum fluorescence) was measured by using non actinic weak light. A single-turnover (ST) protocol consisting of 100 flashlets of $1 \mu\text{s}$ with $2 \mu\text{s}$ of interval was applied for measuring F_m (maximum fluorescence in dark) (Kolber et al., 1988). The maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) was calculated as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m} \quad (7)$$

Samples were then exposed to 10 light steps of increasing PAR (from 0 to $1,500 \mu\text{mol photon.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) for 30-sec each step. The effective quantum efficiency of PSII (F'_q/F'_m) was measured at each light step as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F'_q}{F'_m} = \frac{F'_m - F'_o}{F'_m} \quad (8)$$

Where $F_{m'}$ is the maximum fluorescence under light and F' the steady state fluorescence under light.

The relative electron transport rate (rETR, relative unit) was calculated for each irradiance (E) as :

$$rETR(E) = \frac{F'_q}{F'_m} \cdot E \quad (9)$$

The maximum relative electron transport rate ($rETR_{max}$) was estimated by fitting the FLC data to the model of Webb et al. (1974) modified by Boatman et al. (2019) using ACT2RUN (Chelsea Technologies, UK) software to estimate α and E_k with α , the initial slope of the FLC, and E_k the light saturation index :

$$rETR(E) = \alpha \cdot E_k \cdot (1 - e^{\frac{-E}{E_k}}) - \beta \cdot E_{k\beta} \cdot (1 - e^{\frac{-(E-E_k)}{E_{k\beta}}}) \quad (10)$$

$rETR_{max}$ is calculated as :

$$rETR_{max} = \alpha \cdot E_k \quad (11)$$

Using the absorption algorithm of Oxborough et al. (2012), the PSII electrons flux per unit volume is calculated as follows :

$$a_{LHII} = \frac{F_m \cdot F_o}{F_m - F_o} \cdot K_c \quad (12)$$

where K_c is an inherent constant of the FRRf. Finally, the PSII flux per unit volume ($JV_{II_{max}}$) is calculated as :

$$JV_{II_{max}} = a_{LHII} \cdot rETR_{max} \cdot 3600 \cdot 10^{-6} \quad (13)$$

where $JV_{II_{max}}$ is expressed in $\text{mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$.

The electron transport rate ($ETR_{II_{max}}$) is calculated as :

$$ETR_{II_{max}} = JV_{II_{max}} \cdot [chl a]^{-1} \quad (14)$$

where $ETR_{II_{max}}$ is expressed in $\text{mmol e}^- \cdot \text{mg chl a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

2.3.2 Enrichment experiment

Bioassays were designed to assess the impacts of enrichment on phytoplankton assemblages and on physiological responses. The design was modified from Ly et al. (2014) to fit our specific requirements. Seawater was sampled on the 29th of August 2019 at the SMILE buoy site during the bloom event. The seawater was filtered just after sampling on a 100- μm mesh to remove grazers. One hour after sampling, enrichments were applied to 500-ml sub-samples in polycarbonate bottles to perform the bioassays. All the bioassays were incubated in a water bath incubator under natural sunlight for 5 days. The water bath incubator was continuously fuelled with seawater pumped directly from the sea to maintain the temperature. The seawater temperature and PAR were recorded at 5-min intervals by respectively, a RBRsolo T logger and a RBR solo³ PAR logger connected to a Li-COR “Underwater Quantum Sensor” LI-192. Five types of enrichments, each with five replicates, were performed in the incubator : C (control, no enrichment), P (+P), N (+N), NSI (+N + Si) and PNSI (+P + N + Si). The enrichments applied to the bioassays were defined by the maximum value of N, P and Si measured over the year 2018 in the Bay of Seine by the National Network for Environmental Survey SOM-LIT (<https://www.somlit.fr/> since 2007 at this site) as respectively 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for N, 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for P and 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for Si.

After 5 days, after homogenisation, 25 ml were sampled from all the bioassay bottles to measure photosynthetic parameters, and phytoplankton functional types and alkaline phosphatase activity (APA). At day 5, supplementary measurements of TEP, nutrients and Chla concentration were performed. Only the data obtained at day 5 are shown here. All the measurements were also made just before enrichment at day 0 (D0).

2.3.3 Photosynthetic measurements

Photosynthetic measurements were performed with a second FRRf-ACT2. The same protocol as the one described above for *in-situ* measurements was applied to the samples for incubation. A 5-ml aliquot of sample was placed in the measuring chamber of the FRRf-ACT2 and FLC were performed after a 5-min period of dark adaption.

2.3.4 Flow cytometry

Unfixed sample were analysed within one hour of sampling with the CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherland) equipped with a blue laser (488 nm, 50 mW) and a green laser (552 nm, 50 mW). This produces pulse shapes based on the inherent optical properties of the particle when they cross the laser : sideward angle scatter (SWS), forward scatter (FWS), red (FLR, 668-734 nm), orange (FLO, 601-668 nm) and yellow fluorescence (FLY, 536-601 nm). The threshold was set at 16 mV to reduce data acquisition concerning non-photosynthetic particles triggered on FLR, for each sample (5 per enrichment) 380 μ l were analysed with a speed of 2.0 μ l.s⁻¹. The CytoSense can analyse chains, cells, or colonies between 1 and 800 μ m in diameter, microspheres measuring between 1 μ m (Yellow-Green fluorescent, FluoSpheres®) and 1.6 μ m (non-fluorescent, provided by Cytobuoy) were used to calibrate size recording (daily use). In order to improve the clustering a mix of bead were analysed with the 1 μ m and 1.6 μ m and supplementary beads after this experiment (2 μ m, 6 μ m, 10 μ m, 20 μ m, Fluoresbrite® YG microsphere, Polyscience) to establish size regression (2-6 μ m and 6-20 μ m) and discriminate picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton. To distinguish the phytoplankton (Fig. 19), five clusters were determined using the cells' optical properties and attributed to *Synechococcus* spp., picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton, Cryptophytes and *Lepidodinium chlorophorum* (Elbrächter & Schnepf, 1996; Hansen et al., 2007). The *Synechococcus* spp. cluster has the smallest FWS signal and a high orange fluorescence (FLO) signal which matches very small cells with a high concentration of phycoerythrin.

To accurately define the cytometric signature of *L. chlorophorum*, this species was isolated from the water sample during the bloom event. After a few days in culture, the isolated strains of *L. chlorophorum* were analysed on the CytoSense to match the signature. Picoeukaryotic cells are small cells (< 2 μ m) and produce low FLR and FWS signals. Nanoeukaryotics and microphytoplankton cells were differentiated from picoeukaryotic cells using the amplitude of the FLR signal and the bead signal. Cryptophyte clusters have higher FLO than *Synechococcus* due to the high concentrations of phycoerythrin in

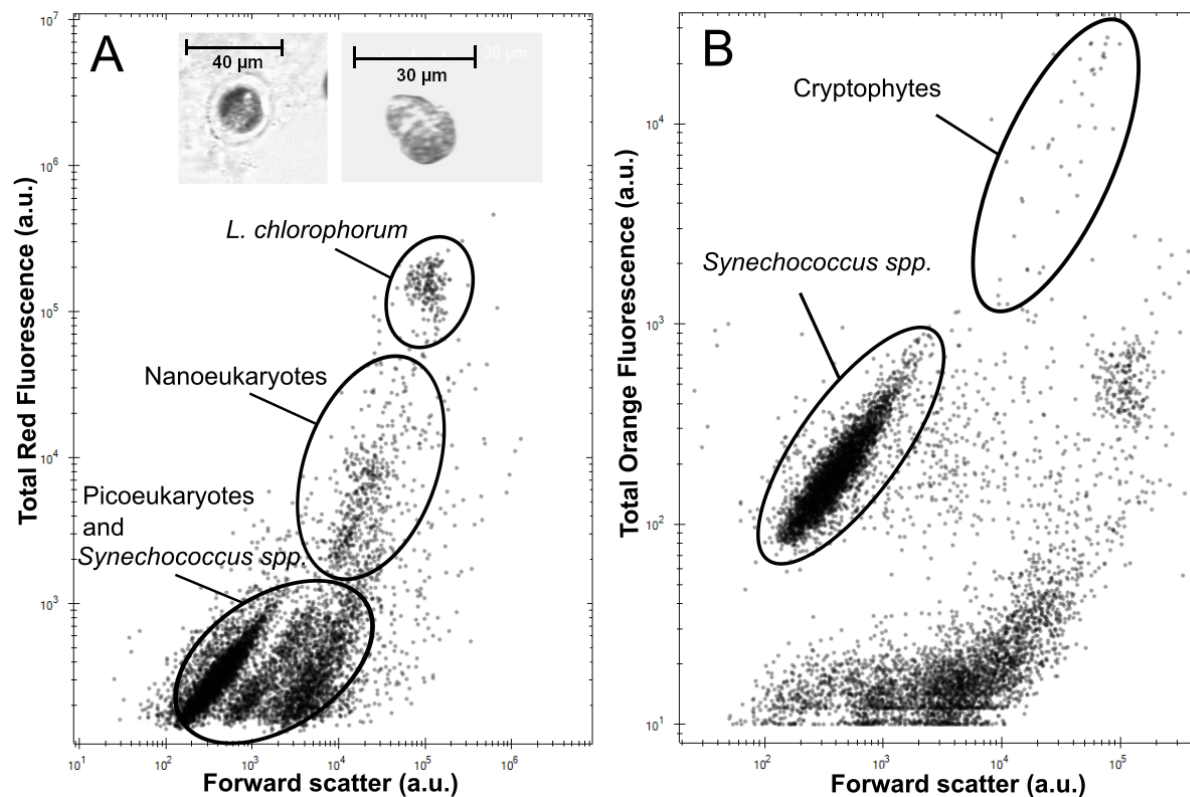


FIGURE 19 – Cytograms obtained from Cytoclus 4 software of a bioassay sample analysed with the CytoSense. (A) Cytogram of Total red fluorescence (a.u.) vs. Total forward scatter allowing identification of Picoeukaryotes and *Synechococcus*, Nanoeukaryotes and *L. chlorophorum*., with pictures taken by the CytoSense : *L. chlorophorum* with TEP (left) and *L. chlorophorum* (right). (B) Cytogram of Total orange fluorescence (a.u.) vs. Total forward scatter allowing identification of *Synechococcus* spp. and Cryptophytes.

their cells and an FWS equivalent to the nanoeukaryotic and microphytoplankton cells (Olson et al., 1989; Thyssen et al., 2014).

2.3.5 Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$)

Water samples were collected and filtered through a cellulose acetate filter (ClearLine, CA, 33 mm, 0.45 μm) in 50 ml falcon tubes and immediately frozen (-20 °C), with the exception of $\text{Si}(\text{OH})_4$ (4 °C). Analyses were conducted using a Seal Analytical AA-3 system (Aminot & Kérouel, 2007). The limits of quantifications were 0.02 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for PO_4^{3-} and 0.05 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for NO_3^- , NO_2^- , $\text{Si}(\text{OH})_4$. N:P ratio was calculated as $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)/\text{PO}_4^{3-}$.

2.3.6 Chlorophyll-a measurements

Water samples (250 ml) were filtered through a glass-fiber filter (Whatman, GF/F, 47 mm) and immediately frozen (-20 °C) until analysis. Ten ml of 90% acetone (v/v) were added to extract the pigment and the samples were then left in the dark at 4 °C for 12 h. After being centrifuged for 5 min at 1,700 g twice, the Chl a concentration of the extracts was measured using a Trilogy fluorimeter (Turner Designs, Sunnyvale, USA) according to the method of Strickland & Parsons (1972).

2.3.7 Transparent exopolymeric particles (TEP)

Water samples (150-200 ml) were filtered through polycarbonate membrane filters (Millipore, 0.4 μ m) and immediately frozen (-20 °C) until analysis. According to Claquin et al. (2008) adapted from Passow and Alldredge (1996), the filters were stained with a solution 0.02 % Alcian blue (Sigma) with 0.06 % acetic acid (pH : 2.5). Excess dye was removed by adding water before centrifugation at 3,000 g, 19 °C for 15 min. This washing cycle was repeated twice, then 6 ml of 80 % H₂SO₄ were added. After 2 h, measurements were conducted using a spectrometer (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) at 787 nm. Calibration were done using a xanthan gum (10-700 μ g) as standard, as described by Claquin et al. (2008). After being divided by the Chla concentration, TEP concentrations are expressed in μ g Xanthan eq. μ g chla⁻¹.

2.3.8 Alkaline phosphatase activity (APA)

APA, as the potential maximum activity per chlorophyll unit, was measured according to (Hrustic et al., 2017). Samples (3920- μ l) were placed in an UV-cuvette and 80 μ l of 4-Methylumbelliferyl phosphatase (MUF-P) 500 μ M substrate were added. While incubating at room temperature, the samples were measured at hourly intervals over a total period of 7 h. Measurements were taken with a RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Japan). APA was calculated as the slope of the linear regression of the evolution of concentration while incubating. Using a MUF standard curve, the results are expressed in concentration units per hour divided by the concentration in Chl *a* to normalize (nM.h⁻¹. μ g chla⁻¹.l⁻¹).

2.3.9 Statistical and data analysis

Analyses were conducted using R software (R-project, CRAN) version 3.6.1. As the incubation data did not follow a normal law, a Kruskal-Wallis test was performed using “stats” package and a Conover-Iman pairwise test was performed using the “conover.test” package. Only significant tests with a p-value < 0.05 were accepted.

2.4 Results

2.4.1 Bloom time series

High frequency measurements provided by the SMILE buoy are presented in Fig 20. An increase in FFU and oxygen saturation on the 24th of August indicated the beginning of the bloom and remained high until the end of the bloom event on the 30th of August, 2019 (Fig. 20 A, B). The highest dissolved O₂ concentration and FFU were measured on the 27th of August with respectively 16.5 mg O₂ .l⁻¹ and 165 FFU. This highest value of FFU was also reached the 28th, 29th and 30th August because of a saturation of the FFU sensor. The lowest oxygen concentration ever recorded in 2 years (data available) was measured the 31th August with a value of 5.9 mg.l⁻¹. Based on the variation in O₂ and FFU, the bloom lasted six days. The temperature increased from 19.3 °C on the 20th of August to reach a maximum of 23.0 °C on the 27th of August and decreased to 19.6 °C on the 3rd of September (Fig. 20 C). This short rise in temperature occurred after a drop in temperature starting on the 27th of August. Turbidity increased on the 27th of August, three days after the beginning of the bloom, to reach 120 NTU before dropping on the 29th of August (Fig. 20 D). Between the 25 and 30th of August, high freshwater input events were observed, leading to a drop in salinity from 33.7 to 31.4 on the 29th of August (Fig. 20 E). The light pattern appeared to be quite stable between days (with a maximum of 1,600 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) with a decrease at mid-bloom (Fig. 20 F).

Nutrients N, P, Si followed the typical summer trend observed at this site in the English Channel (see Data SOMLIT, the French Coastal Monitoring Network; <https://www.somlit.fr/> since 2007 at this site) with low stocks of nutrients at the beginning of August followed by nutrient inputs at the end of the month (Napoléon et al., 2012). An increase in PO₄³⁻ and NO₃⁻ concentrations was observed on the 21th of August just before the bloom began (Fig. 21 B, C, D). After the beginning of the bloom, NH₃ increased from 2.3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ to 5.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ on the 4th of September (Fig. 21 A). During the bloom, a decrease was observed in the concentration of PO₄³⁻ from 1.7.10⁻¹ to 0.2.10⁻¹ $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Fig. 21 D) whereas there was an increase in NO₃⁻ which reached 1.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ and increased the N:P ratio to 71 (Fig. 21 E) on the 26th of August. The OPUS sensor enabled nitrate concentrations to be monitored at a higher frequency (20-min intervals) than the WIZ sensor (24-h intervals). Both sensors showed the same general trend for NO₃⁻ with an increase at the beginning of the bloom event followed by a decrease on the 29th of August (Fig. 21 B, C). The high frequency data provided by the OPUS sensor revealed a dramatic drop in NO₃⁻ concentrations on the 26th of August, two days after the beginning of the bloom (Fig. 21 C). The concentration on Si(OH)₄ on the 30th of August was 13.16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ according to the SOMLIT database and the Si:N and Si:P ratios were respectively 8.7 and 329.0.

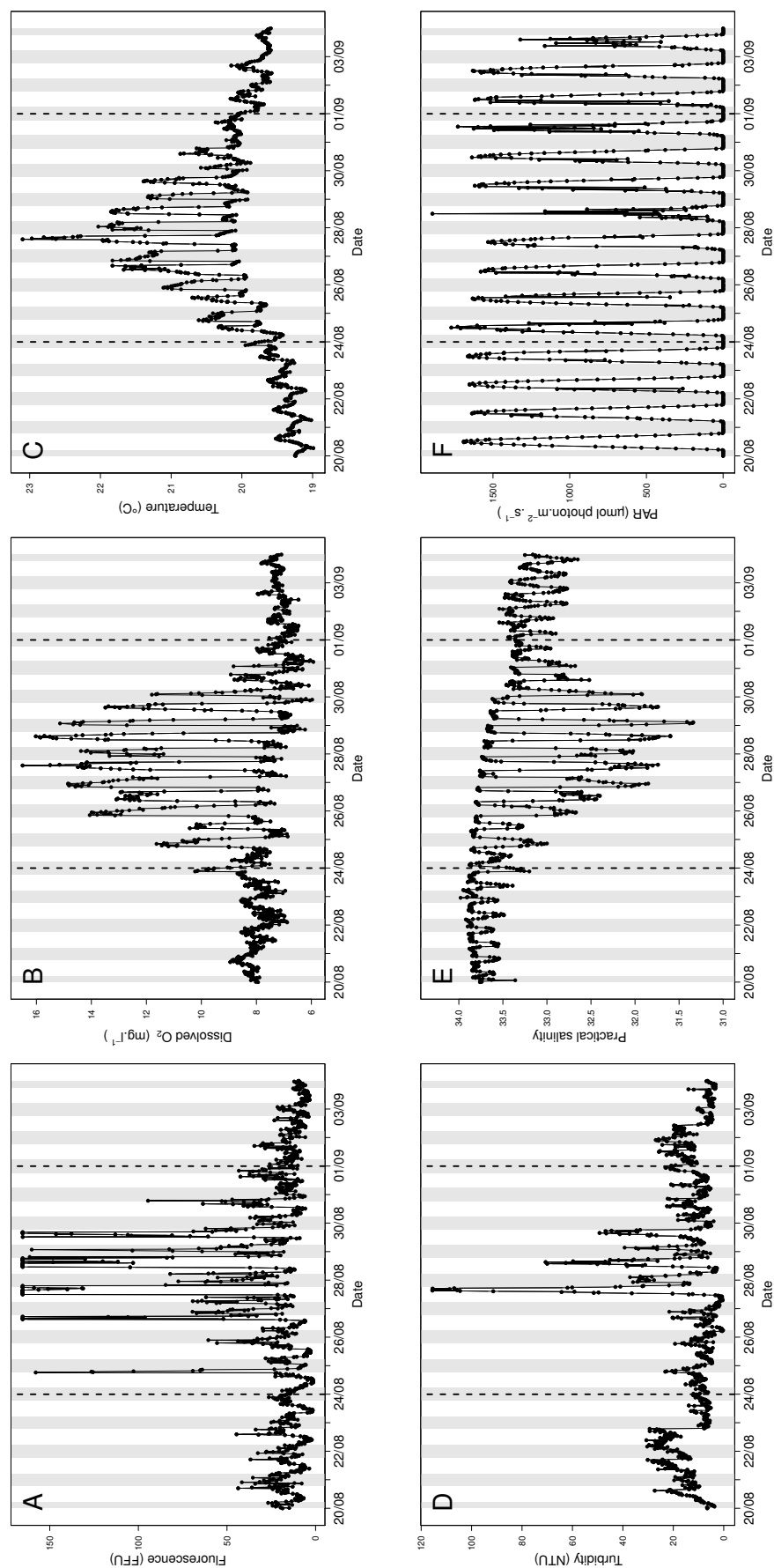


FIGURE 20 – Figure 3 : SMILE buoy temporal series : fluorescence (FFU) (A), dissolved O_2 concentration (B), Temperature (C), Turbidity (D), Practical salinity (E), PAR (F). Dashed lines demarcate the bloom event, shadow areas show night period.

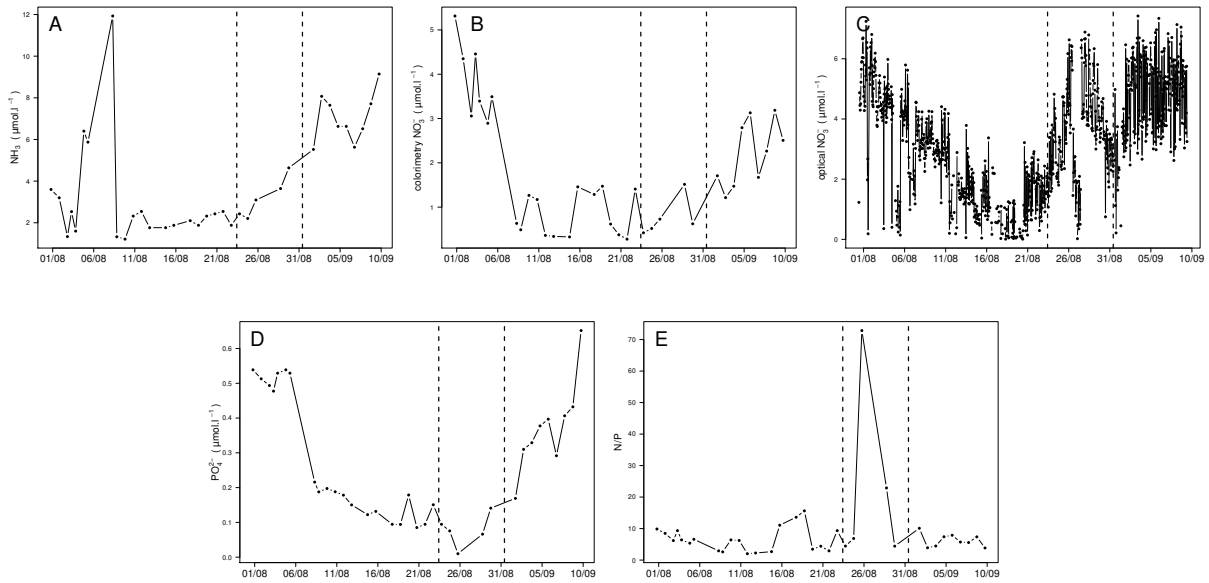


FIGURE 21 – SMILE nutrient temporal series : NH_3 concentration (A), NO_3^- measured with WIZ sensor (colorimetry) (B), NO_3^- measured with Opus probe (optic) (C), PO_4^{3-} concentration (D), N:P ratio (E) dashed lines demarcate the bloom event.

Fv/Fm displayed a daily cyclic pattern, the overall decrease of Fv/Fm the first day (from 20th to 26th August) is less than 0.03. Daily variation display more variation than this overall decrease, the mean value for this 6-days period is 0.57 ± 0.01 (n=60). The Fv/Fm dropped on the 26th of August and reached a minimum value of 0.30 on the 28th of August. Finally, Fv/Fm increased to reach a value of 0.55 on the 1st of September (Fig. 22 A). $\text{JV}_{II\max}$ showed a daily cycle based on the daily light cycle. $\text{JV}_{II\max}$ values showed a steadily rising trend that reached a peak of $89.51 \text{ mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ on the 28th of August. After this peak, a dramatic drop in $\text{JV}_{II\max}$ values was observed. The $\text{JV}_{II\max}$ value reached a value of $89.5 \text{ mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ on the 27th of August (Fig. 22 B). $\text{ETR}_{II\max}$ values also showed a daily cycle, in which the values increased steadily before a dramatic drop on the 28th of August. The $\text{ETR}_{II\max}$ reached a value of $29.4 \text{ mmol e}^- \cdot \text{mg chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ on the 3rd of September (Fig. 22 C).

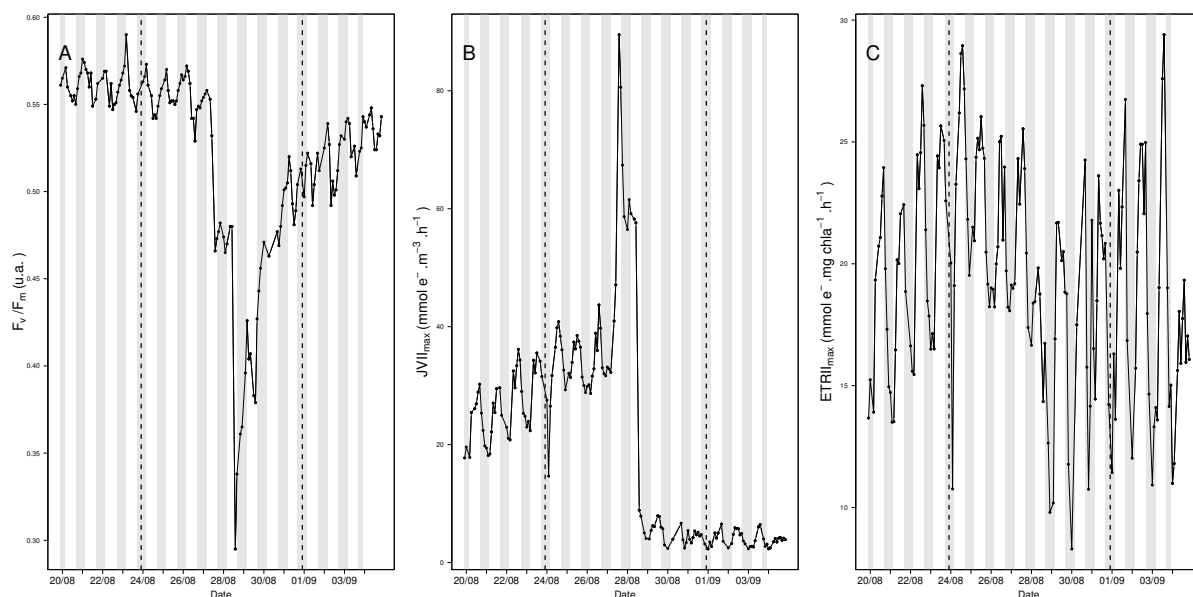


FIGURE 22 – SMILE buoy FRRf temporal series : The maximum quantum efficiency of PSII (A), maximal PSII electrons flux per unit volume (B), maximal electron transport rate per chla unit (C). Dashed lines demarcate the bloom event, shadow areas show night period.

2.4.2 Incubation results

During the 5-day incubation period, the mean value of the water temperature was 19.8 °C and the maximum value of the PAR was 2112 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ with an overall mean value during daily light periods of 441 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

The initial inorganic nutrient pool was low in the D0 sample with 3.0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ of nitrate and a phosphate value below the detection limit ($< 0.02 \mu\text{mol.l}^{-1}$). After incubation, nitrate concentrations in N and NSi enrichments decreased from 53 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (D0 value + enrichment) to $31.5 \pm 7.65 \mu\text{mol.l}^{-1}$ in each enrichment (Fig 23. A), silica was not consumed in the NSi enrichment (mean = 54.28 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Fig 23. C). In the P enrichment, the phosphate concentration decreased from 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (D0 value + enrichment) to $1.9 \pm 0.15 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Fig 23. D). Finally, in the NPSi enrichment, both nitrate and phosphate were nearly fully consumed with $3 \pm 0.07 \mu\text{mol.l}^{-1}$ of nitrate and $0.09 \pm 0.05 \mu\text{mol.l}^{-1}$ of phosphate left while only $19 \pm 2.14 \mu\text{mol.l}^{-1}$ of silica remained at the end of the incubation period. After 5 days of incubation, the concentration of Chl *a* decreased in the control, P, N, and NSi enrichments compared to the D0 value of 8.51 ± 1.04 (n=3) whereas in the NPSi Chl *a* concentration (Fig. 24 A) increased significantly (mean = 22.16 $\mu\text{g.l}^{-1}$, Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 13.6$; $p_{\text{value}} = 8.6.10^{-3}$, Conover : mean $p_{\text{value}} = 1.9 10^{-3}$).

Some common patterns regarding cells concentration were observed in the cytometric phytoplankton groups in all bioassays with enrichment. In the group of smaller cells :

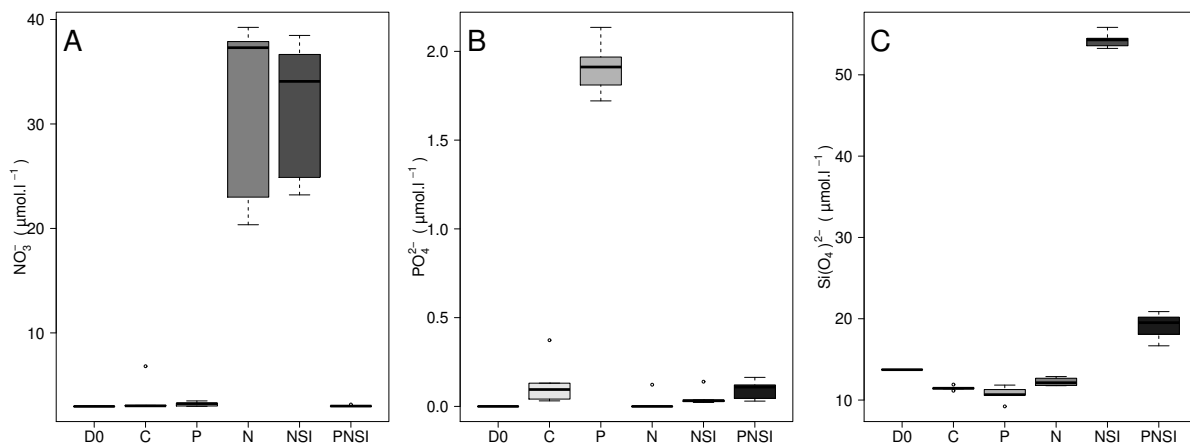


FIGURE 23 – Bioessay experiment, nutrients concentrations : NO_3^- concentration (A), PO_4^{3-} concentration (B), Si(OH)_4 concentration (C)

Synechococcus, the number of cells dropped after 5 days of incubation with no significant difference between enrichments (Fig. 24 B). Regarding picoeukaryotes, the mean concentration of cell in the P enrichment ($2.0 \cdot 10^4 \pm 3.8 \cdot 10^3 \text{ cells.cm}^{-3}$) was higher than the control, and the N and NSi enrichments, with mean values of respectively, $1.8 \cdot 10^4$, $8.6 \cdot 10^3 \pm 2.8 \cdot 10^3$ and $7.3 \cdot 10^3 \pm 2.3 \cdot 10^3 \text{ cells.cm}^{-3}$. NPSi enrichment showed the highest concentration of picoeukaryotes (mean = $5.4 \cdot 10^4 \pm 1.5 \cdot 10^4 \text{ cells.cm}^{-3}$) (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 19.0$, $p_{\text{value}} = 7.9 \cdot 10^{-4}$) (Fig. 24 C). Nanoeukaryotes also showed the highest concentration for NPSi enrichment with $9.9 \cdot 10^4 \pm 3.4 \cdot 10^4 \text{ cells.cm}^{-3}$ (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 13.3$, $p_{\text{value}} = 1.2 \cdot 10^{-2}$, Conover : mean $p_{\text{value}} = 1.7 \cdot 10^{-3}$). Regarding other treatments, controls contained higher concentrations of nanoeukaryotes ($2.4 \cdot 10^3 \pm 8.8 \cdot 10^2 \text{ cells.cm}^{-3}$) than other enrichments with respectively $2.1 \cdot 10^3 \pm 4.5 \cdot 10^2$, $1.8 \cdot 10^3 \pm 1.0 \cdot 10^3$ and $1.9 \cdot 10^3 \pm 9.1 \cdot 10^2 \text{ cells.cm}^{-3}$ with P, N and NSi enrichments (Fig. 24 D). Cryptophytes exhibited the same trend as nanoeukaryotes with a higher concentration in the control than in P, N and NSi enrichments (Fig. 24 E) while NPSi enrichment showed the significant higher concentration ($\chi^2 = 17.5$, $p_{\text{value}} = 1.4 \cdot 10^{-3}$, Conover : mean $p_{\text{value}} = 4.2 \cdot 10^{-3}$), but the value may be too low to draw conclusion. Finally, with an initial concentration of $389 \pm 166 \text{ cells.cm}^{-3}$ *L. chlorophorum* decreased in all clusters except for the NPSi enrichment. The lowest concentration of $127 \pm 26 \text{ cells.cm}^{-3}$ was measured in controls while the highest was observed in NPSi enrichment with $1,876 \pm 1,496 \text{ cells.cm}^{-3}$. The difference in NPSi enrichment observed in this species was highly significant (Kruskal-wallis : $\chi^2 = 18.5$, $p_{\text{value}} = 9.7 \cdot 10^{-4}$, Conover : mean = $2.2 \cdot 10^{-4}$) compared to in all the other enrichments (Fig. 24 F). The values measured for *L. chlorophorum* in the incubation are consistent with the maximum concentration value observed in august 2010, in the Bay of Seine by the French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters (REPHY, DOI : 10.17882/47248) with $418.3 \text{ cells.cm}^{-3}$.

Low values of APA $1.2.10^{-3} \pm 1.5.10^{-4}$ nM.h⁻¹.mg chl a⁻¹.l⁻¹ were measured at D0 just after sampling. After incubation, APA increased in all enrichments by a factor of 15, 19; 24.8; 44.6; 4.4 respectively, in the control, P, N, NSi and NPSi enrichments compared to at D0. The minimum value of $6.6.10^{-3} \pm 3.9.10^{-3}$ nM.h⁻¹.mg chl a⁻¹.l⁻¹ was observed in the NPSi cluster (Fig. 24 G) but no significant differences were found among enrichments (Kruskall-Wallis test). As observed for APA, the concentration of TEP increased in all treatments except in the NPSi enrichment where TEP decreased. The concentration of TEP increased by a factor of 3 in the P enrichments (0.3 ± 0.05 µg Xanthan equ.µg chl a⁻¹), by a factor 1.9 in both the N and NSi enrichments (0.5 ± 0.21 µg Xanthan equ.µg chl a⁻¹). NPSi enrichment presented the lowest concentration (0.043 ± 0.03 µg Xanthan equ.µg chl a⁻¹) but no significant differences were found among the treatments because of the high variability of the results between replications (Fig. 24 H).

Fv/Fm had a significantly high value in the NPSi enrichment with a mean of 0.46 ± 0.03 (Kruskall-Wallis : $\chi^2 = 10.6$, $p_{value} = 3.0.10^{-2}$, Conover : mean $p_{value} = 1.2.10^{-2}$) (Fig 25. A) which is higher than the D0 value. The highest maximum production capacity (JV_{II}max) was also measured in the NPSi enrichments (Fig 25. B) with a value of 162 ± 77 mmol e⁻.m⁻³.h⁻¹ revealing a significant difference from that in the other treatments (Kruskall-Wallis : $\chi^2 = 9.7$, $p_{value} = 4.0.10^{-2}$, Conover : mean $p_{value} = 3.6.10^{-2}$) and again higher than the D0 value (6.1 mmol e⁻.m⁻³.h⁻¹). The highest electron transport rate (ETR_{II}max) was measured in the P and NSi enrichments (Fig 25. B) with values of respectively, 15.5 ± 5.2 , 15.3 ± 6.5 mmol e⁻.mg chl a⁻¹.h⁻¹. A value of 8.1 ± 3.1 mmol e⁻.mg chl a⁻¹.h⁻¹ was measured in the NPSi enrichment but no significant differences were found between this and the other treatments (Kruskall-Wallis : $\chi^2 = 10.6$, $p_{value} = 3.0.10^{-2}$, Conover : mean $p_{value} = 7.6.10^{-2}$) (Fig 25. C), the value is however lower than the D0 value (21.7 mmol e⁻.mg chl a⁻¹.h⁻¹).

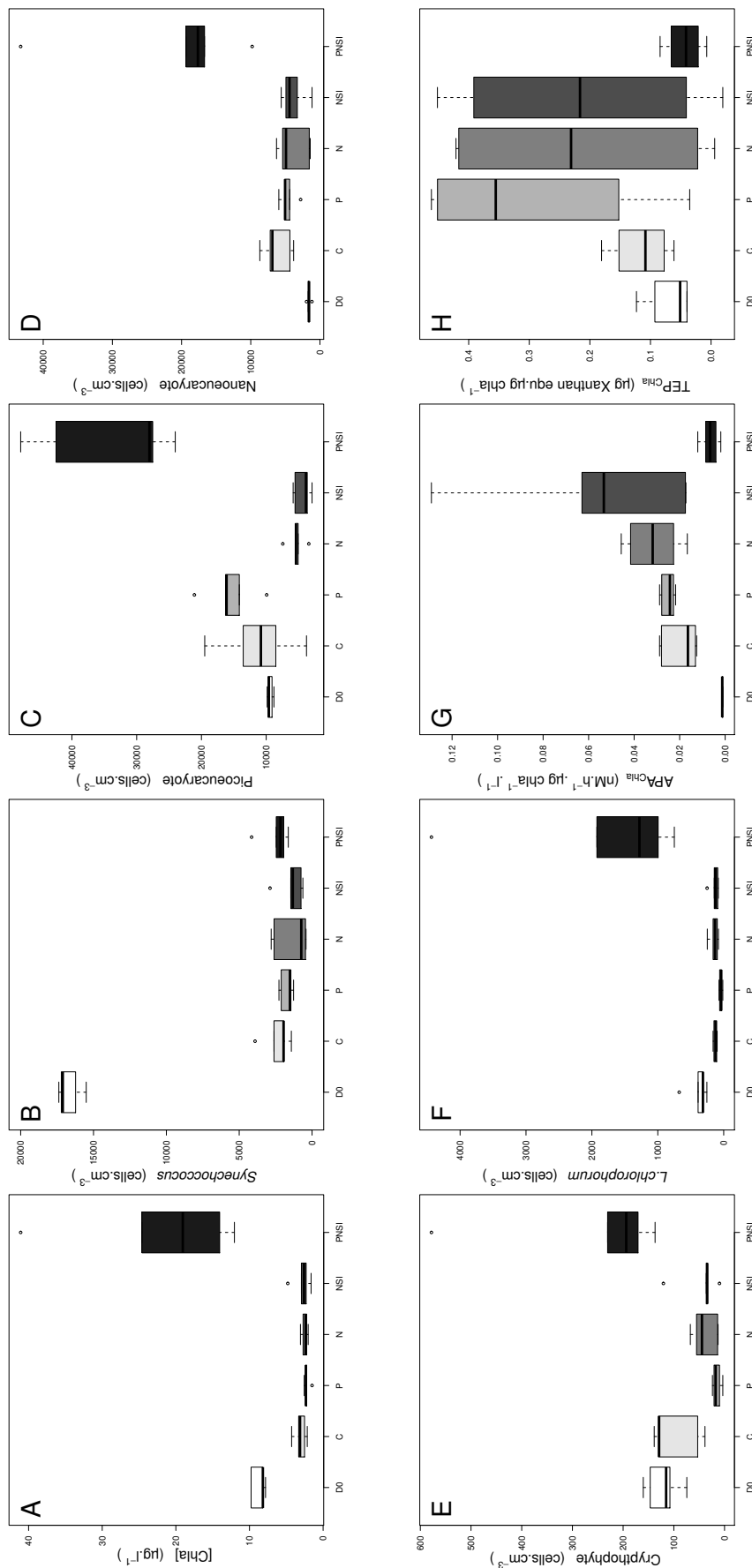


FIGURE 24 – Figure 7 : Bioassay experiment, phytoplankton communities results : Chla concentration (A), *Synechococcus* concentration (B), Picoeucaryotes concentration (C), Nanoeucaryotes concentration (D), Cryptophytes concentration (E), *L. chlorophorum* concentration (F), normalised APA production (G), normalised TEP production (H).

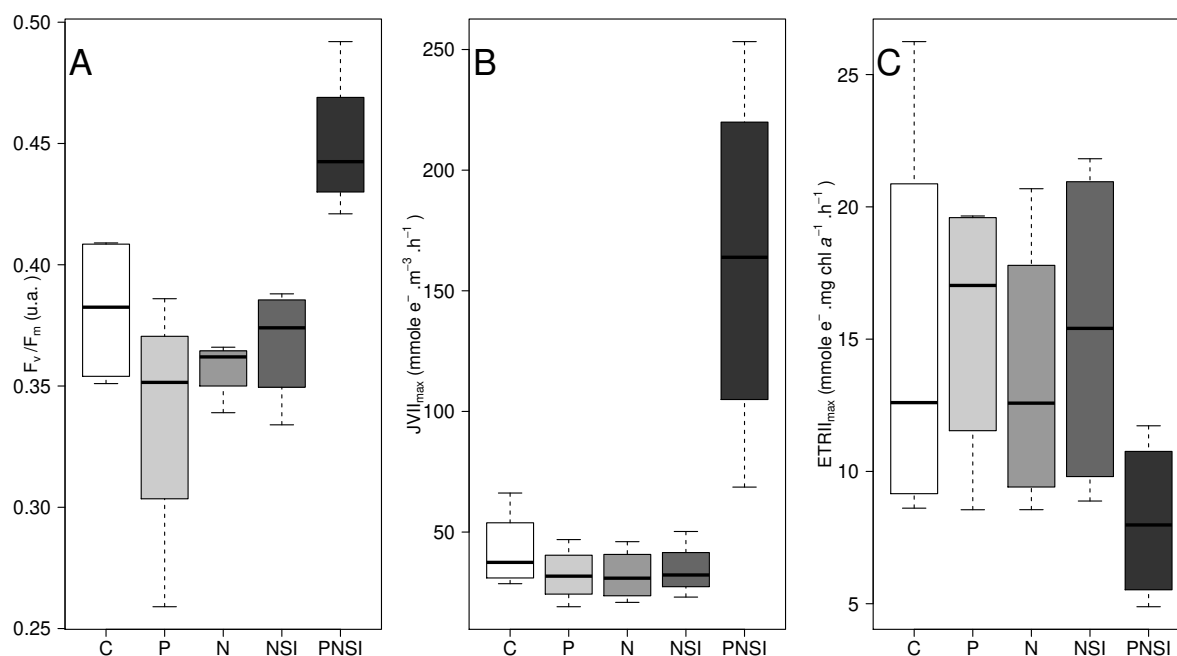


FIGURE 25 – Figure 8 : Bioessay experiment, photosynthetic parameter : The maximum quantum efficiency of PSII (A), maximal PSII flux per unit volume (B), maximal electron transport rate per chl a unit (C)

2.5 Discussion

The high frequency data provided by the instrumented buoy SMILE alerted us to the occurrence of a HAB bloom dominated by the Dinophyceae *Lepidodinium chlorophorum* in late August 2019, in the Bay of Seine. *L. chlorophorum* contained green chloroplasts probably derived from a prasinophyte endosymbiont (Hansen et al., 2007). Dinophyceae species with green chloroplasts are rare (Hansen et al., 2007) and to our knowledge *L. chlorophorum* is the only “green Dinophyceae” that has been identified in the English Channel (Sournia et al., 1992 and REPHY data base), so we were able to define a specific cytometric signature to characterise this species in our samples. The cytometric signature was confirmed in a strain isolated during the bloom thus allowing us to be extremely confident in our determination and the counting of *L. chlorophorum* in the present study. Although *L. chlorophorum* was first described in the English Channel in 1982 (Sournia et al., 1992), its ecology is still poorly documented. It is described as an euryhaline species, able to produce dinocysts (Elbrächter & Schnepf, 1996; Honsell & Talarico, 2004), with an optimum growth temperature of 22 °C established by Claquin et al. (2008) using a *L. chlorophorum* strain isolated in the English Channel. The conditions at the end of August 2019 were suitable to trigger a major *L. chlorophorum* bloom. The monitoring data from the SMILE buoy revealed the influence of nearby river outflows which, in summer, in the Bay of Seine, are defined as warmer and more turbid freshwater inputs enriched

in nutrients (Morelle et al., 2018; Napoléon et al., 2012). As already reported in many studies, these factors favour Dinophyceae blooms (Glibert, 2016), whose *L. chlorophorum* (Pozdnyakov et al., 2017) underlined the importance of rises in temperature while (Karasiwicz et al., 2020; Siano et al., 2018) pointed to the role of a drop in salinity during *L. chlorophorum* bloom events. Beside this general behaviour, which is widely described in the literature, our high-frequency data allowed us to monitor both the bloom and nutrient dynamics and the physiological state of the community in detail. The combination of a rise in temperature, a drop in salinity and nutrient inputs characteristic of estuarine waters triggered a bloom event in the bay which lasted six days on the monitoring site. After six days, the level of fluorescence dropped to its original value, marking the end of the bloom. The end of a bloom event can be triggered by different processes, such as a predatory (Tiselius & Kuylenstierna, 1996), virus event (Schroeder et al., 2003) or nutrient depletion (Walve & Larsson, 2007). In the present study, the high N:P ratio points to phosphate depletion. Thus, P appears to be a limiting nutrient and can be assumed to be the main driver of the decline in the bloom. Previous studies demonstrated that a bloom collapse can be explained by phosphate limitation (Walve & Larsson, 2007). The hypothesis of a P-limited bloom is supported in this study by the Fv/Fm value, which underwent a dramatic drop associated with a decline in biomass estimated by FFU one day after this drop. A value of 0.56 was measured for the Fv/Fm during the first three days of the bloom event, then decreased to 0.29 at mid bloom. This decrease could be partly due to a non-photochemical quenching mechanism (Harrison & Smith, 2013) but in our case, the minimum value appeared to be tightly linked to the increase in the N :P ratio. In the literature, a drop in the maximum quantum yield has been associated with nutrient limitation (Behrenfeld et al., 2004; Claquin et al., 2010), rapidly rising temperatures (Zhang et al., 2012), a change in salinity (D'ors et al., 2016), or even a parasitic event (Park et al., 2002). As *L. chlorophorum* tolerate a rise in sea temperature and a drop in salinity (Pozdnyakov et al., 2017; Siano et al., 2018), in our case, we assume that the decline in the maximum quantum yield was most likely caused by the phosphate limitation. P limitation has been shown to significantly reduce the Fv/Fm in natural communities, in the field (Napoléon et al., 2012), in bioassays (Ly et al., 2014), and in lab cultures (Napoléon et al., 2013; Tan et al., 2019; Wongsansilp et al., 2016; Wu et al., 2012). Besides, the maximum quantum yield decreased at mid bloom; the $JV_{II_{max}}$ remained high because of the high level of biomass, and then dropped dramatically with the collapse of the bloom.

High-frequency sampling enabled by the SMILE buoy provided evidence for a link between P limitation and the collapse of a HAB bloom of *L. chlorophorum*. In a more general context, dinoflagellates have been associated with eutrophication since industrial development (Kim et al., 2018) and a recent shift has been observed (Fischer et al., 2020; Klais et al., 2013; Spilling et al., 2018) at global scale comprising an increase in the dinoflagellate/diatom ratio. Wasmund (2017) pointed to the relationship between an increase in the dinoflagellate/diatom ratio and a decrease in the quality indicator of environmental status assessment. The same trend has been described in the western English channel

(Widdicombe et al., 2010) and in the Bay of Somme (Hernández-Fariñas et al., 2014). High-frequency monitoring allowed to understand and characterise short term processes and the factors which can trigger a large-scale bloom event and its fate. A bioassay enrichment experiment was performed during the bloom event to more deeply explore the behaviour and possible, control of bloom dynamics. Studying enrichments in a phytoplankton community involved in a natural bloom event is quite rare, and this enrichment bioassay enabled us to test other outcomes and their effects on phytoplankton communities as well as on several physiological indicators. However, the results obtained during the incubation have to be carefully consider in comparison with *in situ* data because the daily dynamics was not followed during the five days and many factors like hydrodynamics or grazing for example were removed. Beyond drawing a parallel between our microcosm experiments and our observations of a natural bloom, this second step of our study allowed us to investigate experimentally shifts in phytoplankton diversity during a HAB of *L. chlorophorum* and its effect on ecological functions such as primary productivity as a function of nutrient inputs. The relationship between primary productivity and biodiversity drives ecosystem biomass production and is a therefore a major question of ecological functioning and ecosystem management (Hodapp et al., 2019).

The first outcome of this experiment was the remarkable behaviour of NPSi enrichment in comparison with other treatments. NPSi enrichment resulted in higher concentrations of almost all cytometric populations apart from *Synechococcus*. Bloom communities were not sustained by partial enrichment in N, or P or NSi. Only NPSi enrichment was able to trigger growth of the phytoplankton community. Unfortunately, an NP enrichment could not be performed because only five conditions could be tested into our incubator. Despite the absence of NP enrichment conditions, the experiment highlighted an apparent N, P co-limitation in this bioassay. N and P had to be added to significantly stimulate growth. Furthermore, it is important to note that in the NPSi enrichment, unlike Si, N and P were depleted. Such co-limitations have been extensively studied and discussed in coastal ecosystems (Davidson & Howarth, 2007) and NP inputs are known to promote dinoflagellate growth (Reynolds, 2006). During our experiments, the growth of all cytometric eukaryotic phytoplankton communities was stimulated under NPSi enrichment. Our results showed that the growth of *L. chlorophorum* was only stimulated in the fully replete condition.

A higher primary production capacity ($JV_{II_{max}}$) and a higher physiological status (Fv/Fm) were observed in the NPSi enrichment while lower productivity capacity ($ETR_{II_{max}}$) was measured in comparison with other treatments. The decoupling of production ($JV_{II_{max}}$) and productivity ($ETR_{II_{max}}$) in the NPSi enrichment was unexpected. This decoupling can be attributed to the size community structure, as differences in productivity between picoeucaryote, nanoeukaryote and microphytoplankton have been reported (Lefebvre et al., 2012; Li et al., 2011; Zhu et al., 2019) and may be one consequence of photoacclimatation processes. The increase in biomass in the NPSi enrichment reduced light penetration and increased self-shading (Huisman & Weissing, 1994) leading to an increase

in the concentration of Chla in the photosystem antenna (Falkowski & LaRoche, 1991; MacIntyre et al., 2002). Such regulation has been associated with an internal increase in pigment self-shading, thereby reducing the pigment-specific light absorption coefficient (σ_{PSII}) (Finkel et al., 2004). In our study, the lowest specific light absorption coefficient (σ_{PSII}) at 440 nm (Kolber et al., 1988) was measured in the NPSi enrichment (See Supplementary Fig. 26). Therefore, the self-shading mechanism makes it possible to explain the uncoupling observed between $JV_{II_{max}}$ and $ETR_{II_{max}}$ in these optimal growth conditions.

APA (as the potential maximum activity per chlorophyll unit) was quantified in order to characterise the P limitation during our experiment (Kuenzler & Perras, 1965; Lin et al., 2016; Tanaka et al., 2006). Alkaline phosphatase enables cells to access organic phosphate but the process is energy consuming (Falkowski & Raven, 1998; Lin et al., 2016). Dinoflagellates can make efficient use of dissolved organic phosphate (Wang et al., 2011), and quantifying APA is one way to assess this use when P is limited. According to the APA, the enrichment conditions applied in this bioassay can be gathered in three groups : (i) high P limitation for N and NSi, enrichments; (ii) medium P limitation for control and P and finally (iii) low P limitation for NPSi enrichment. The lack of any significant difference between controls and P enrichment despite the addition of P is surprising. P enrichment is N limited, which notably affects cell physiology. Previous studies showed that other limitations, like N (Kuenzler & Perras, 1965) or Si (Fuentes et al., 2014), can lead to an increase in APA. Changes in the community structure may also influence APA (Lin et al., 2015; Yuan et al., 2017). The observed differences in the picoeukaryote community under P replete conditions could alter nutrient uptake behaviour because picoeukaryotes are known to be very efficient in assimilating phosphorus. We hypothesise that this community produces more alkaline phosphatase than the other communities observed in the other enrichments. In addition, picoeukaryotes appeared to be favoured by P enrichment. This result showed that picoeukaryote was able to grow under N limitations, which are frequently reported in oligotrophic areas (MacKey et al., 2009; Siokou-Frangou et al., 2010) but rarely in eutrophic areas like the Bay of Seine where N limitation is only observed in summer (Napoléon et al., 2012; Thorel et al., 2017). Our results also showed that *Synechococcus* was unable to grow under any of the conditions we tested, which is probably a bias introduced by our incubation methodology. The closed system could create greater predatory pressure leading to a higher death rate of *Synechococcus* (Agawin et al., 2000a).

Si depletion did not occur either during the bloom event or during the bioassay, but even if Si was not limited during the course of this experiment, diatoms were not able to take over domination from dinoflagellates. In the literature, dinoflagellate dominance over diatoms is frequently reported to be driven by Si depletion (Liang et al., 2019; Zhou et al., 2017). Moreover, previous works showed that both in a natural bay (Lie et al., 2011) and in a model (Tett & Lee, 2005), when the N:Si ratio increases, the dinoflagellate/diatom ratio also increases. This supports our field measurements, which showed that environmental status (temperature and salinity) combined with an input of N and P triggered the

dinoflagellate bloom even though Si was not limiting. Inputs of unbalanced nutrient water would not have triggered the bloom, as shown by the absence of growth in the experiment when only P or N were added.

TEP is widely associated with carbon excretion by phytoplankton (Claquin et al., 2008; Klein et al., 2011) even if bacteria can also promote TEP precursors (Li et al., 2016, 2015). Moreover, in the literature, TEP production is associated with N limitation (Beauvais et al., 2003; Corzo et al., 2000; Deng et al., 2016) or high N:P ratio (Mari et al., 2005). In our study, P, N, NSi enrichments displayed higher TEP concentrations per Chla unit. As mentioned previously, in all these experimental conditions, phytoplankton growth was limited in P or in N. Conversely, under non-limited growth conditions, i.e., the NPSi treatment, TEP production was reduced, which is physiologically coherent. Indeed, TEP can be considered as an overflow of carbon. As nutrient stresses do not allow proper carbon assimilation in the different metabolic pathways, carbon is accumulated as carbohydrates and part is excreted as TEP precursors. *L. chlorophorum* is described in the literature as a high TEP producer (Claquin et al., 2008; Sournia et al., 1992). Claquin et al. (2008) showed under replete conditions that *L. chlorophorum* was able to produce 10 times more TEP than other seven species tested which belonged to the main phytoplankton phyla. Such high TEP production favours the formation of aggregates and the sinking rate (Thornton, 2002) which can lead to anoxia events that affect the benthos community (Passow, 2002). In the present study, an O₂ depletion was observed at the end of the bloom ; but although rare, this event was far from anoxia.

2.5.1 Conclusions

In this study, the entire temporal pattern of a HAB species, *L. chlorophorum*, identified by microscopy and flow cytometry, was monitored. We showed that the high-frequency measurements of physical-chemical and biological parameters provided by the SMILE buoy allowed to detect the triggers of the bloom and its fate. There were not flow cytometer on the buoy, but our study pointed out that such a measurement associated with the others parameter available at high frequency would represent a great opportunity to deeper explorer phytoplankton dynamics and manage HAB events. The bioassay experiments performed during this bloom event allowed to explore physiological regulation at a community scale. The regulation of photosynthetic parameters was investigated as a function of nutrient inputs and of community structure, which made it possible to characterise uncoupling of production and productivity in some circumstances. The bioassay experiments also provided evidence of potential P and N co-limitation in this ecosystem and revealed that unbalanced inputs favour high TEP production with a population dominated by *L. chlorophorum*, which, in turn, can lead to massive bloom, sedimentation, and local oxygen depletion. Management of the nutrient inputs ratio has to be considered both in connection with the triggering - but also with the fate of blooms.

Acknowledgements

We thank Bertrand Le Roy from BOREA for *L. chlorophorum* isolation, Tania Hernández-Fariñas from Ifremer for her comments and advices and the COAST-HF network for technical support. This work was funded by the SMILE² and RIN ECUME projects respectively supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie*, the European Regional Development Fund of Normandie, and *La Région Normandie* and by the PLEASE PhD project supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie* and *La Région Normandie*

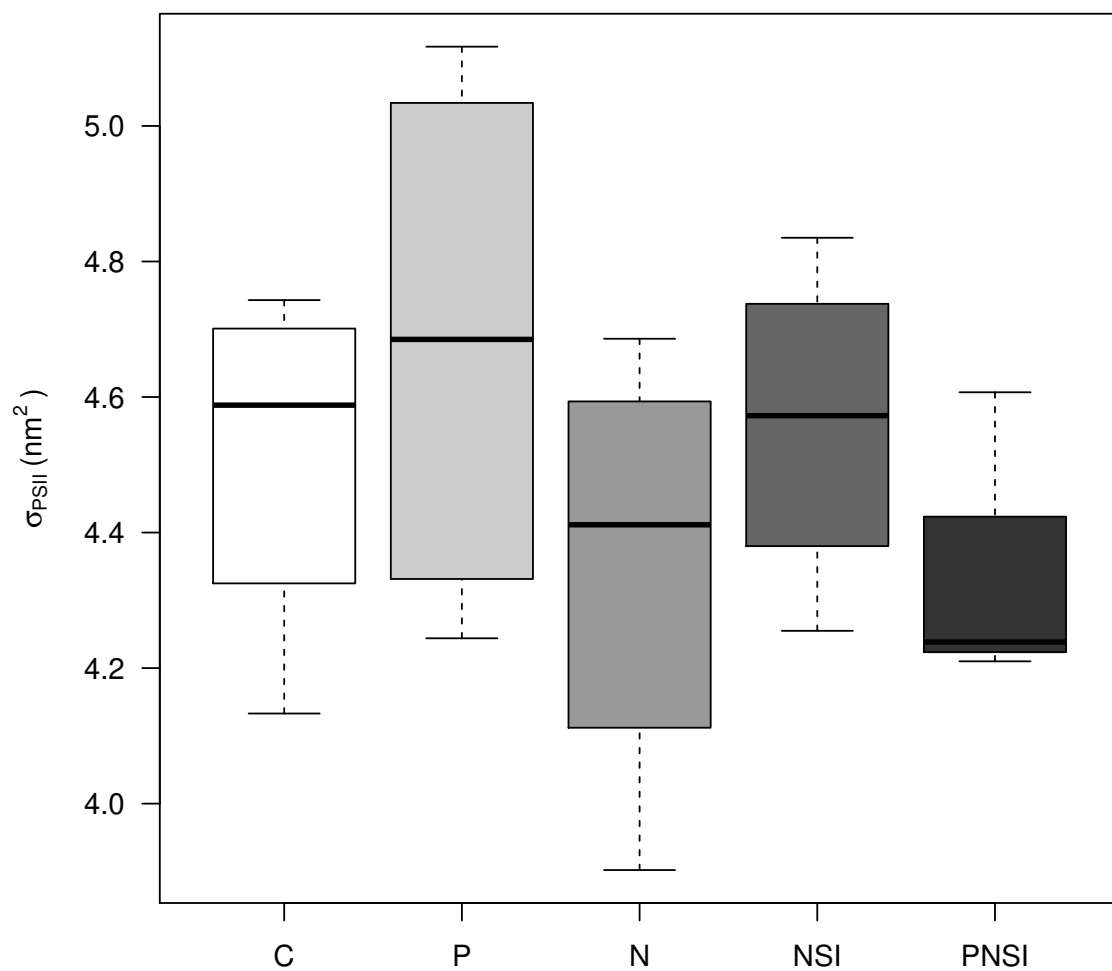


FIGURE 26 – Bioessay experiment, FRRf σ_{PSII} .

Chapitre 3

Indication de co-limitation de la
croissance phytoplanctonique en baie
de Seine avec une approche RUE

3.1 Résumé

Afin de mieux cerner l'effet de la composition des sels nutritifs sur les communautés phytoplanctoniques de la baie de Seine, des expériences en microcosmes ont été réalisées à partir d'eau prélevée au niveau de la bouée SMILE. Dix neuf expérimentations ont ainsi été menées sur deux années. Ces expérimentations ont consisté à effectuer des enrichissements en sels nutritifs (témoin, P, N, N+Si, N+P, N+P+Si) et d'évaluer leurs impacts sur la biomasse (chl *a*), sur le statut physiologique (Fv/Fm), sur l'APA, sur la concentration en TEP, et sur la structure des communautés caractérisée par cytométrie en flux.

Les résultats mettent en évidence une co-limitation N & P des communautés testées. De plus, le rapport de Redfield (N:P = 16) apparaît être optimal pour la croissance des populations comme en témoigne les fortes valeurs de biomasse mesurées pour un rapport N:P proche de 16. Cet optimum à 16 est confirmé par la physiologie puisque la production d'APA et de TEP est minimale pour ce rapport et les valeurs de Fv/Fm sont plus élevées pour les enrichissements en N et P.

La silice semble n'avoir qu'un effet secondaire par rapport au N et au P puisque les enrichissements N+P et N+P+Si font partis d'un même cluster de l'analyse multivariée. Cette dystrophie affecte différemment les populations, la proportion de picoeucaryotes est très fortement liée aux indicateurs de dystrophie.

Afin de mieux caractériser le lien entre les sels nutritifs et la croissance, une approche basée sur l'efficacité d'utilisation de la ressource (RUE) est utilisée. Une nouvelle manière de calculer l'efficacité d'utilisation de la ressource est proposée (RUE_{NP}) dans ce travail. Ce nouveau calcul permet de prendre en compte la co-limitation et la stoechiométrie des systèmes ce qui est essentiel pour les écosystèmes côtiers déséquilibrés.

Nous avons montré que les valeurs de RUE_{NP} sont liées à la structure en taille des communautés phytoplanctoniques. En effet, le RUE_{NP} est corrélé positivement à la proportion des plus grosses cellules ($> 2 \mu\text{m}$) et négativement à la proportion des petites cellules ($< 2 \mu\text{m}$).

La distribution des sels nutritifs dans la baie et leur stoechiométrie en particulier celle du N et du P affectent donc la physiologie, la croissance et la structure des communautés. Malgré l'existence du dystrophie importante du système, les communautés phytoplanctoniques conservent un optimum autour des rapports des Redfield. Ce résultat doit aider à la gestion des écosystèmes côtiers en précisant les optimums stœchiométries de ces écosystèmes et en caractérisant les effets de la dystrophie.

Colimitation assessment of phytoplankton growth using a resource use efficiency approach in the Bay of Seine (French-English Channel).

Léon Serre-Fredj^{a,b}, Léo Chasselin^{a,c}, Oriane Jolly^{a,c}, Franck Jacqueline^d, Pascal Claquin^{a,b*}

- a. Normandie Université, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
- b. Laboratoire Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, UMR CNRS 8067), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France.
- c. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine de l'Université de Caen Normandie, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Ifremer LER/N, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port-en-Bessin, France
- d. Ifremer LER/N, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port-en-Bessin, France

*Corresponding Author

Pascal Claquin

Email : pascal.claquin@unicaen.fr

Address : BOREA Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques, FRE 2030 MNHN CNRS SU UA UCN IRD 207, Université de Caen Normandie, Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France

Abstract

Eutrophication and dystrophy are two of the main problems affecting coastal ecosystems. In the Bay of Seine, phosphorus (P) inputs from the Seine estuary have been largely reduced in the last decade, in contrast to nitrogen (N), which leads to high N:P ratio inputs. To study the effect of dystrophy, an enrichment bioassay using water sampled from the Bay of Seine was repeated 19 times over a period of 18 months with six different enrichments. After a few days, chlorophyll *a* (chl *a*), alkaline phosphatase activity (APA), transparent exopolymeric particles (TEPs), cytometric size structure, and maximum quantum yield of photosystem II were measured. The data provide strong evidence for an N & P colimitation system in the vast majority of the incubations, as only the N+P and N+P+Si enrichments supported phytoplankton growth, and Si only appeared to play a secondary role in our incubations. A N:P ratio of 16 equal to the Redfield ratio was identified as the optimum for balanced growth, as chl *a* was the highest and TEP and APA production was the lowest at this ratio. To fit the requirements of the colimited system, a new resource use efficiency (RUE_{NP}) calculation was developed to account for N and P colimitation instead of only one nutrient, as is usually the case. This calculation allows better representation of RUE in dystrophic conditions, as found in many highly anthropized ecosystems. The relationships between RUE_{NP} and the size structure of the phytoplankton community were explored, and a significant positive correlation between RUE_{NP} and larger cells ($> 2 \mu\text{m}$) and a negative correlation with smaller cells ($< 2 \mu\text{m}$) were noted, showing a better use of nutrients by larger cells. This study highlights an increase of RUE_{NP} with the phytoplankton cell size in a colimited system.

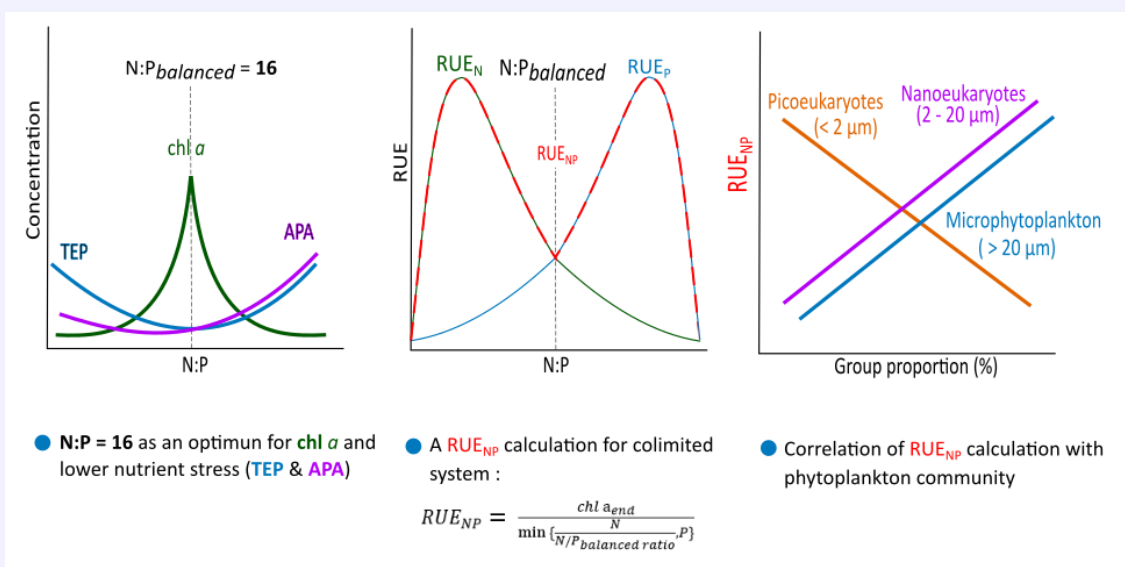


FIGURE 27 – Graphical abstract.

3. Indication de co-limitation de la croissance phytoplanctonique en baie de Seine avec une approche RUE

Keywords : Eutrophication ; N:P ratio ; Alkaline phosphatase activity ; Transparent exopolymeric particles ; Flow cytometry, ecophysiological parameters

3.2 Introduction

Coastal ecosystems provide important economic services, and their decline, due to multiple human pressures, could have long-term impacts (Barbier et al., 2011). The main problem facing coastal ecosystems is eutrophication (Rabalais et al., 2009), caused by excessive inputs of nutrients, usually nitrogen (N) and phosphorus (P), into the system associated with a dystrophic ratio. Phytoplankton uptake is mainly described by the Redfield ratio ($N:P = 16$), which regulates the nutrient system (Falkowski, 2000), but in dystrophic conditions, deviation from this paradigm can be observed at multiple scales from cellular to environmental requirements (Fraga, 2001; Geider & La Roche, 2002; Glibert & Burkholder, 2011; Ptacnik et al., 2010). However, unbalanced nutrient inputs affect phytoplankton community composition (Leruste et al., 2019; Shen et al., 2019) and growth rate (Nwankwegu et al., 2020). Thus, knowing which nutrients limit phytoplankton growth is crucial. Recently, multiple coastal ecosystems have been described as colimited systems (Chorus & Spijkerman, 2020; Conley et al., 2009; Harpole et al., 2011) with N and P as independent nutrients (Saito et al., 2008). The Bay of Seine (France) is a typical eutrophic system, and nutrients are mainly supplied by the Seine River (Aminot et al., 1998) and at a smaller scale by local rivers (Lemesle et al., 2015). In recent decades, nutrient management programmes in the Seine River have successfully reduced nutrient inputs, particularly phosphorus inputs (Aissa-Grouz et al., 2018) by improvement of domestic wastewater treatment, but N levels have nevertheless remained high (Garnier et al., 2019). This causes an abrupt change in nutrient stoichiometry with high N:P ratios measured in both the Seine estuary and the Seine River (Garnier et al., 2019; Meybeck et al., 2018).

One way to better assess the link between the phytoplankton community and nutrients is the resource use efficiency (RUE) parameter. RUE measures the supplied resources converted into biomass (Hodapp et al., 2019) and is useful to characterize the use of nutrients by phytoplankton populations. To our knowledge, only a few authors, e.g., Han et al. (2016), have broached the multiple limitations of RUE, one being that RUE usually focuses on one nutrient at a time (e.g., RUE_N , RUE_P). Today, given the growing interest in colimitation systems, new insights are needed to describe these nutrient regimes more precisely.

Enrichment bioassays are an effective way to investigate the effects of nutrient inputs on the phytoplankton community (Rahav et al., 2018; Reed et al., 2016; Song et al., 2019; Van Meerssche & Pinckney, 2019). Varying the composition, stoichiometry and quantity of nutrients added pinpoint limitation patterns more easily (Tamminen & Andersen, 2007). Repeating the bioassays throughout the year enables the identification of time-dependent interactions (Xu et al., 2010).

To investigate the effect of nutrient enrichment on phytoplankton in the Bay of Seine, we conducted repeated bioassays. After a few days of incubation, the community structure of natural populations of phytoplankton was measured to assess the nutrient regime of the phytoplankton community. A new approach was proposed to calculate a RUE constrained by two colimiting nutrients.

The specific objectives of our study were to investigate the ratio of N:P consumed by the phytoplankton community under unbalanced nutrient input conditions and characterize physiological status and population structure responses to sudden nutrient enrichments. This approach should allow us to identify the limitation system in a dynamic anthropized macrotidal bay at a temperate latitude.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Measurements in the Bay of Seine

High-frequency data were monitored *in situ* over a two-year period using the SMILE (System of Measurement Integrated for Littoral and Environment) buoy. It is a moored buoy localized in the Bay of Seine (0°19'41.00"O 49°21'14.00"N) equipped with physico-chemical and biological sensors working in continuous and autonomous conditions [data available at Claquin et al. (2018)].

In vivo fluorescence (Cyclops-6K, Turner Design, USA) in fluorescein fluorescence units (FFU), temperature (WTWTM, TetraCon, Germany) and turbidity (Seapoint Turbidity Meter, Seapoint Sensors, USA) were measured together in a multiparameter probe NKE instrument (MP7, NKE Instrumentation[®]). Photosynthetically active radiation (PAR) was measured with a Satlantic sensor (Satlantics, Italy). NO₃⁻ was measured with an OPUS optical sensor (TriOS Mess- & Datentechnik GmbH Germany). All these parameters were measured at 20-min intervals at a depth of one metre since 2016.

PO₄³⁻ data and additional NO₃⁻ data come from a bimonthly sampling program [French Coastal Observation Service, <https://www.somlit.fr/>, Cocquempot et al. (2019)] where water has been sampled near the SMILE buoy at a depth of one metre since 2013 and analysed as described in Part 2.2.1.

3.3.2 Enrichment experiment

Bioassays were designed to assess the impacts of enrichment on the phytoplankton assemblages and on their physiological responses. The design was modified from Ly et al. (2014) to fit our specific requirements as described in Serre-Fredj et al. (2021). The experiment was repeated 19 times over a period of 2 years on different dates (see supplementary table for starting date, and Supplementary figure 35). Each incubation will be referred to by its number corresponding to chronological order. Seawater was sampled at the SMILE buoy site. To remove large grazers, the seawater was filtered through a

100- μm mesh immediately after sampling. For the bioassays, enrichments were added to 500-ml subsamples in polycarbonate bottles one hour after sampling and placed in an incubator. All bioassays were incubated in a water bath incubator for 4 to 5 days (see supplementary table for specific duration) under natural sunlight in a greenhouse. The water bath incubator was fuelled continuously with seawater pumped directly from the sea maintaining the incubator to the temperature of the bay. Seawater temperature and PAR were recorded at 5-min intervals using an RBRsolo T logger and an RBR solo³ PAR logger connected to a Li-COR LI-192 Underwater Quantum Sensor, respectively. Up to six types of enrichment treatments, each with five replicates, were performed in the incubator for each incubation experiment : Control with no addition of nutrients (C), +P (P), +N (N), +N+Si (NSI), +N+P (NP), or +N+P+Si (PNSI). The enrichments applied in the bioassays were defined by the maximum value of N ($50 \mu\text{mol.l}^{-1}$), P ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$) and Si ($50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) measured in 2018 in the Bay of Seine by the French Coastal Observation Service (SOMLIT, <https://www.somlit.fr/>, Cocquempot et al. (2019)). Two enrichments were added during the experiment : NSI was added after the 4th incubation experiment, and NP was added after the 13th incubation experiment.

After 4 or 5 days, 25 ml was sampled in all bioassay bottles and homogenized before measuring photosynthetic, flow cytometer and alkaline phosphatase activity (APA). TEP, nutrient and chlorophyll *a* (chl *a*) concentrations were also measured at day 4 or 5. APA was included after the 7th incubation and TEPs after the 9th incubation.

The analyses, duration, and enrichments performed are summarized in the additional table.

3.3.3 Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)

Water samples were collected and filtered through a ClearLine, CA, 33 mm, $0.45 \mu\text{m}$ cellulose acetate filter and immediately frozen (-20°C), with the exception of Si(OH)_4 , which was stored at 4°C . Analyses were conducted using a SEAL Analytical AA3 system (Aminot & Kérouel, 2007). The quantification limits were $0.02 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for PO_4^{3-} and $0.05 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for NO_3^- , NO_2^- , Si(OH)_4 . The N:P ratio was calculated as $\text{NO}_3^- / \text{PO}_4^{3-}$. The $\text{N:P}_{\text{consumed}}$ was calculated as $(\text{N}_{\text{start}} - \text{N}_{\text{end}}) / (\text{P}_{\text{start}} - \text{P}_{\text{end}})$, where N_{start} and P_{start} represent the concentrations of N and P at the beginning of the incubation (i.e., the stock of nutrients in the sampled water plus specific enrichment) and N_{end} and P_{end} the concentrations of N and P at the end of the incubation.

3.3.4 Chlorophyll-*a* measurements

Water samples (250 ml) were filtered through a Whatman GF/F 47 mm, $0.7 \mu\text{m}$ glass-fibre filter and immediately frozen (-20°C) until analysis. Ten millilitres of 90 % acetone (v/v) was added to extract the pigment, and the samples were then left in the dark at 4°C for 12 h. After being centrifuged for 5 min at 1,700 g twice, the concentration of chl *a* in the extracts was measured using a Trilogy fluorometer (Turner Designs, Sunnyvale, USA)

according to the method of (Strickland and Parsons, 1972). The $\Delta\text{chl } a$ is calculated as $\text{chl } a_{\text{end}} - \text{chl } a_{\text{start}}$.

3.3.5 Transparent exopolymeric particles (TEP)

Water samples (150-200 ml) were filtered through Millipore, 0.4 μm polycarbonate membrane filters and immediately frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until analysis. Following Claquin et al. (2008) adapted from Passow & Alldredge (1996), the filters were stained with a solution of 0.02% Alcian Blue solution (Sigma) with 0.06 % acetic acid (pH : 2.5). Excess dye was removed by adding water before centrifugation at 3,000 g at $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. This washing cycle was repeated twice, after which 6 ml of 80 % H_2SO_4 was added. After 2 h, measurements were taken using a Pharmacia Biotech Ultrospec 1000 Spectrophotometer at 787 nm. Calibration was performed using xanthan gum (10-700 μg) as a standard, as described in Claquin et al. (2008). After being divided by the chl a concentration, TEP concentrations are expressed in $\mu\text{g Xanthan eq.}\mu\text{g chl } a^{-1}$.

3.3.6 Alkaline phosphatase activity (APA)

The potential maximum APA per chlorophyll unit was measured according to Hrustic et al. (2017). Samples (3,920 μl) were placed in a UV cuvette, and 80 μl of 500 μM 4-methylumbelliferyl phosphatase (MUF-P) substrate was added. While incubating at room temperature, the samples were measured at hourly intervals over a total period of 7 h. Measurements were made with an RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Japan). APA was calculated as the slope of the linear regression. Using an MUF standard curve, the results are expressed in concentration units per hour divided by the concentration in chl a to normalize by the biomass, thus obtaining $\text{APA}_{\text{chl } a}$ ($\text{nM.h}^{-1}.\mu\text{g chl } a^{-1}.\text{l}^{-1}$).

3.3.7 Fluorometry to assess photosynthetic parameters

To measure the maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m), three fluorimeters were used during the experiment : a Water PAM (Walz, Germany), a FRRf-ACT2 (Chelsea Technologies, UK) and a LabSTAF (Chelsea Technologies, UK). Oxidation of quinone A (Q_A) in the samples was analysed after a 5-min period of incubation in the dark.

For the water-PAM measurements, the sample was excited by weak blue light (1 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 470 nm, frequency 0.6 kHz) to record the minimum fluorescence (F_0). The maximum fluorescence (F_m) was obtained during a multiturnover (MT)-saturating light pulse (0.6 s, 1700 $\mu\text{mol photons.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$, 470 nm), which enabled reduction of the quinone A (Q_A) pool.

For the ACT2-FRRF measurements, a single turnover (ST) saturation phase was delivered with one hundred 1- μs flashlets at 2- μs intervals to measure F_0 and maximum

fluorescence (F_m) (452 nm) using the biophysical model of Kolber et al. (1998).

For the LabSTAF measurements, a single turnover (ST) saturation phase was delivered with a solid 100- μ s flash (450 nm) to measure minimum and maximum fluorescence, as described in Boatman et al. (2019).

Following Genty et al. (1989), the maximum quantum efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_m) was calculated in Equation 15 :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m} \quad (15)$$

A discrepancy in the F_v/F_m measurement is known between the different methods of variable fluorometry used Kromkamp & Forster (2003). Therefore, data normalization per incubation (between 0 and 1) allowed us to compare the whole set of incubations.

3.3.8 Flow cytometry

Unfixed samples were analysed within one hour of sampling with a CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherland) equipped with a blue laser (488 nm, 50 mW) and a green laser (552 nm, 50 mW). This produces pulse shapes based on the inherent optical properties of the particle when they cross the laser : sideward angle scatter (SWS), forwards scatter (FWS), red (FLR, 668-734 nm), orange (FLO, 601-668 nm) and yellow fluorescence (FLY, 536-601 nm). The threshold was set at 16 mV to reduce data acquisition concerning nonphotosynthetic particles triggered on FLR; for each sample (5 per enrichment), 380 μ l was analysed with a speed of 2.0 μ l.s⁻¹. CytoSense can analyse chains, cells, or colonies between 1 and 800 μ m in diameter. Microspheres of 1 μ m (yellow-green fluorescent, FluoSpheres®), 1.6 μ m (nonfluorescent, provided by Cytobuoy) and 2 μ m, 6 μ m, 10 μ m, and 20 μ m (Fluoresbrite® YG microspheres, Polyscience) were used to calibrate size recordings (daily use). To distinguish the phytoplankton (Supplementary Fig. 2), five clusters were determined using the cells' optical properties and attributed to *Synechococcus* spp., picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton and cryptophytes. The *Synechococcus* spp. cluster has the smallest FWS signal and a high orange fluorescence (FLO) signal, which matches very small cells with a high concentration of phycoerythrin.

Picoeukaryote cells are small cells (< 2 μ m) and produce low FLR and FWS signals. Nanoeukaryotic (2–20 μ m) and microphytoplankton (> 20 μ m) cells were differentiated from picoeukaryotic cells using the amplitude of the FLR signal and the bead signal. cryptophytes clusters have higher FLO than *Synechococcus* due to the high concentrations of phycoerythrin in their cells and an FWS equivalent to the nanoeukaryotic and microphytoplankton cells (Olson et al., 1989; Thyssen et al., 2014).

3.3.9 RUE calculation

RUE is the amount of biomass produced per unit of supplied resource (Hodapp et al., 2019). The equation proposed by Ptacnik et al. (2008) to calculate RUE (chl a /total P) is quite simple and is the one most frequently reported in the literature (Chai et al., 2020; Filstrup et al., 2019; Lehtinen et al., 2017; Yang et al., 2021) with total P as the limiting nutrient. This equation can also be used with other limiting nutrients, including N (Amorim & Moura, 2021; Frank et al., 2020; Olli et al., 2015; Otero et al., 2020). The dissolved inorganic fraction (DIN or DIP) can also be used instead of the total elemental concentration (Amorim & Moura, 2021; Otero et al., 2020). The need to consider stoichiometry constraints for RUE calculation has already been highlighted in Frank et al. (2020).

Thus, to fit the colimitation hypothesis (Arrigo, 2005; Saito et al., 2008), we considered more than one nutrient. The concept of colimitation and/or alternation between N and P limitation according to Davidson & Howarth (2007) and Elser et al. (2007) describes how, depending on the balance, N and P could incrementally limit growth one after another until one is too low for uptake. The nutrient present in the smallest proportion will be the last limiting nutrient in the sequence. To directly compare the concentration of both nutrients (N & P), a scale of limitation has to be applied. The simplest approach largely admitted is to consider the Redfield ratio as the balanced N:P ratio (Falkowski, 2000; Lips & Lips, 2008), even if it can be discussed primarily in the context of coastal anthropized ecosystems (Arrigo, 2005; Chorus & Spijkerman, 2020; Glibert & Burkholder, 2011). Then, N:P ratios lower than 16 are considered N limited, and ratios higher than 16 are considered P limited.

Based on the equation of Ptacnik et al. (2008), a RUE_{NP} equation using the N:P ratio was applied :

$$RUE_{NP} = \frac{chl\ a_{end}}{\min\left\{\frac{N}{N/P_{balanced\ ratio}}, P\right\}} \quad (16)$$

where chl a_{end} is the concentration at the end of the incubation, N and P concentrations correspond to values of N_{start} and P_{start} of NO_3^- and PO_4^{3-} , respectively, at the beginning of each incubation (i.e., the stock of nutrients in the sampled water plus specific enrichment). Here, the $N:P_{balanced\ ratio}$ accounts for the 16/1 Redfield ratio (Redfield, 1958) (Equation 2). The minimum function (min) makes it possible to account for the last limiting nutrient in the alternating nutrient limitation system.

In other words, this RUE_{NP} calculation is equal to RUE_P when $N:P > N:P_{balanced}$ and to RUE_N when $N:P < N:P_{balanced}$ (Figure 28). This prevents underestimation of the RUE value in dystrophic cases. To illustrate the case of an extremely high N:P (e.g., 300), the RUE_N would be reduced due to the excessive presence of N, even if the limiting nutrient here is P, thus making the RUE_P more appropriate. The RUE_{NP} allows to cover both dystrophic cases.

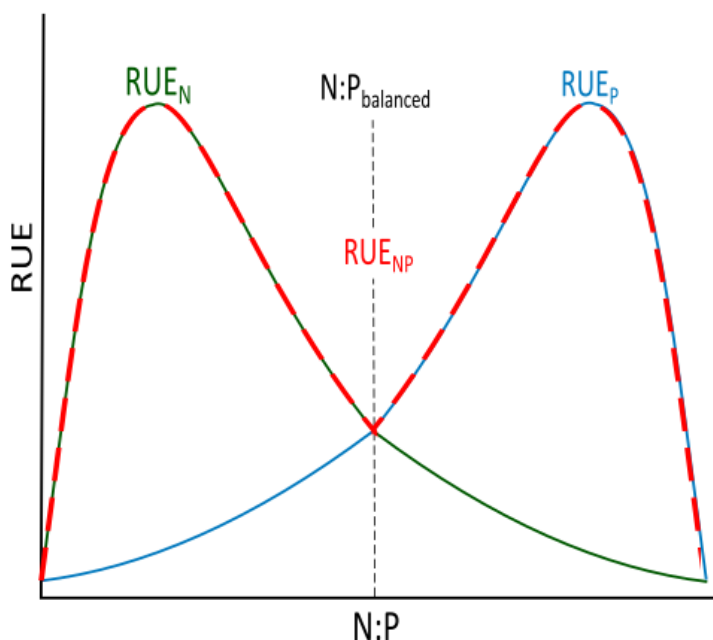


FIGURE 28 – Variation in different RUEs based on the N:P ratio. RUE_{NP} (dashed red) overlay RUE_P (blue) and RUE_N (green). The black dashed line displays the tipping point of the RUE_{NP} calculation where RUE_{NP} is equal to either RUE_N or RUE_P . RUE_N and RUE_P curves are inspired by a Holling type IV functional response. This figure is modified from Hodapp et al., (2019).

3.3.10 Statistical analysis

All analyses were conducted in R (R-project, CRAN) version 3.6.1. To better display variations due to the enrichment data used for the heatmap (e.g., Figures 30, 31, and 32) are all normalized between 0 and 1 per incubation, such that the maximum value of the parameter in each incubation is 1 and the minimum is 0. As the incubation data did not follow a normal distribution, a Kruskal–Wallis test was performed using the “stats” package, and a Conover-Iman pairwise test was performed using the “conover.test” package. Only significant tests with a p value < 0.05 were accepted. PCA and hierarchical cluster analyses were performed using the “FacoMineR” (Lê et al., 2008) and “factoextra” (Kassambara, 2017) packages. The last six incubations were included in the multivariate analysis (13th to 19th incubations) to include all types of enrichment. TEP, APA, RUE_{NP} , biomass, cytometric count and proportion were used in these analysis. The number of clusters for the k-means clustering analysis was chosen using silhouette analysis.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Environmental parameter in the Bay

Figure 29 shows two years of high-frequency data in the Bay of Seine measured by the SMILE buoy. The temperature ranged from 8.1 °C to 22.5 °C, and a maximum fluorescence value of 481 FFU was recorded on the date of the 19th sampling (12/10/2020) (Fig. 29. A). Fluorescence followed standard patterns (Napoléon et al., 2012) with higher values in spring and summer, while late blooms could occur in autumn, as shown by the 9th incubation event, which represented the highest value in 2019 (170 FFU) (Fig. 29. B). The two inorganic nutrients (NO_3^- and PO_4^{3-}) displayed the opposite pattern of temperature, i.e., replenished in winter and depleted in summer due to nutrient consumption. NO_3^- ranged from the limit of detection 0.01 to 69.27 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Fig. 29. C) and PO_4^{3-} ranged from the limit of detection 0.02 to 1.01 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Fig. 29. D). A wide range of variation is depicted by the incubation that may affect phytoplankton community and response even if a majority (60 %) are gathered within the high production zone from May to October. Out of this time period, light intensity may be more limiting than nutrients, as displayed by replenishing nutrient levels (Napoléon et al., 2014, 2012). Moreover, some extreme events are present, such as the 9th or 19th incubation, which both account for massive blooms, as flagged by the fluorescence increase.

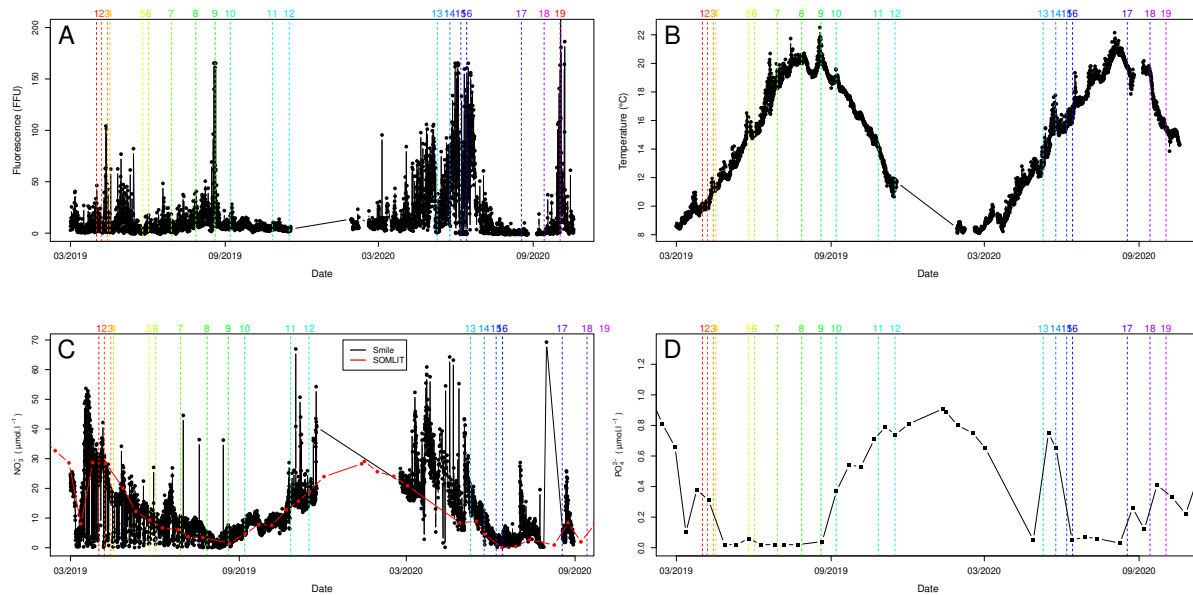


FIGURE 29 – SMILE buoy temporal series : fluorescence (FFU) (A), temperature (°C) (B), NO_3^- measured with Opus probe in black and by the SOMLIT national network in red ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (C), PO_4^{3-} concentration from SOMLIT national network (D). Coloured vertical dotted lines display the start of each numerated incubation.

3.4.2 Phytoplankton growth link with nutrient balance

Figure 30 presents the chl a_{start} concentration measured at the beginning of the incubation and final concentration for each enrichment for all bioassays and all enrichments. The results showed that in 17 incubations out of 19, NPSi enrichment presented the highest chl a concentration (Fig. 30. A). Both NP and PNSi enrichments showed high chl a concentrations with averages of $20.9 \mu\text{g chl } a^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ and $24.5 \mu\text{g chl } a^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$, respectively, and differed significantly from other treatments (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 29.26$, $p_{\text{value}} = 5.4 \times 10^{-5}$; followed by Conover test, $p_{\text{value}} = 3.6 \times 10^{-4}$, 8.7×10^{-4}). This result highlights evidence for colimitation of N and P, as NP and PNSi enrichment displays maximum growth. The lack of a significant difference between NP and NPSi indicates the secondary role of Si. Incubations 3, 5, 10, 11 and 12 display little to no growth regardless of the enrichment, indicating other limitations. As underlined in Section 3.1, this could be due to suboptimal temperature and light conditions for phytoplankton growth.

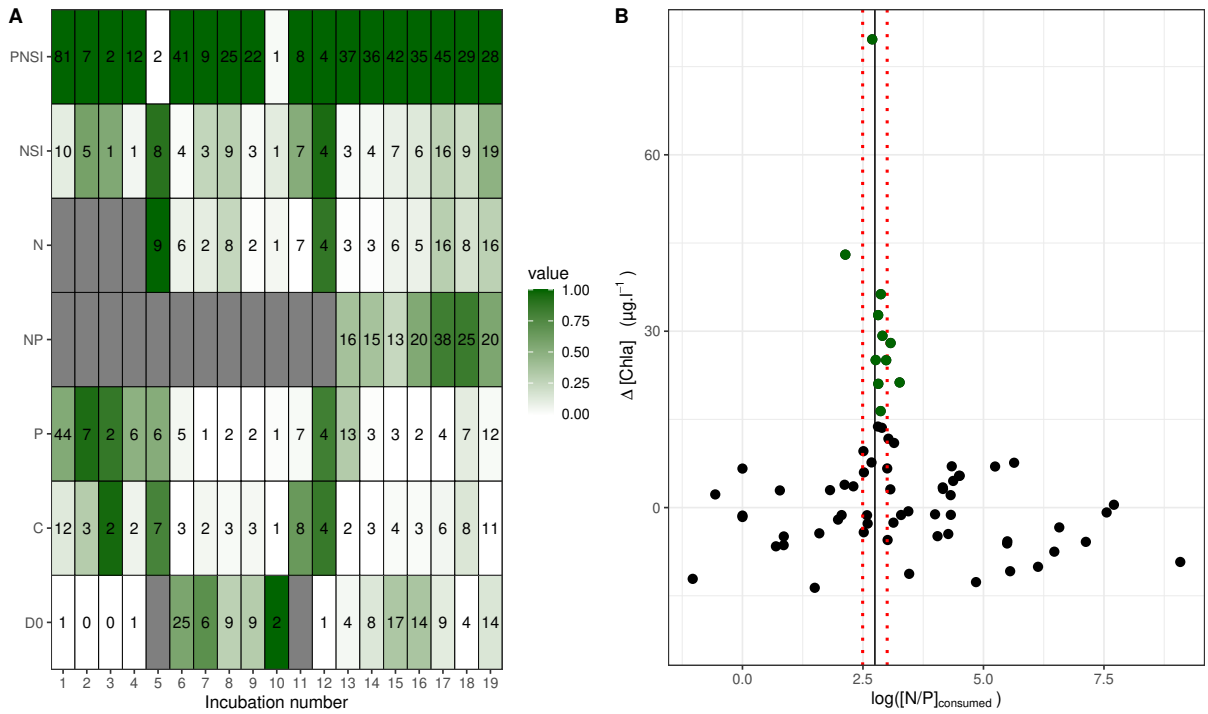


FIGURE 30 – Heatmap of normalized chl a measurement by enrichment and by incubation; values are nonnormalized. Grey values indicate lack of data (A). Relationship between phytoplankton growth $\Delta\text{chl } a \text{ (}\mu\text{g.l}^{-1}\text{)}$ and the $N:P_{\text{consumed}}$ ratio (a.u.), the green dots represent the 90th percentile points, the dashed black line represents the mean 90th percentile, and the red line represents the standard deviation (B). D_0 indicate the value before incubation of the experiment.

When compared to the $\log$ of the $N:P_{\text{consumed}}$ ratio during the incubation, the chl a distribution showed a peak. The weighted mean of the 9th percentile of the chl a distribution corresponding to the $N:P$ ratio peak value was 16.01, which corresponds to the Redfield ratio (Fig. 30.B). This optimum growth of the phytoplankton community at a

N:P Redfield is not surprising (Klausmeier et al., 2004) and is in agreement with the results of a recent study by Zheng et al. (2020), who showed a consumed N:P ratio of 16 in the overenriched Bohai Sea in China. However, a discrepancy from this ratio could have been expected under dystrophic input (Geider & La Roche, 2002; Glibert & Burkholder, 2011).

3.4.3 Limitation assessment by physiological parameter

3.4.3.1 APA - TEP

TEP_{chl a} displayed a nonhomogenous distribution in the “high-TEP_{chl a} concentration” groups, with C, P, N, and NSi enrichments, and in the “low-TEP_{chl a} concentration” group, with D₀, NP and PNSi enrichments (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 36.5$, $p_{\text{value}} = 2.2 \times 10^{-6}$; followed by the Conover test : mean p value = 5.9×10^{-4}) (Fig. 31. A). When TEP_{chl a} concentrations were compared to log(N:P), the minimum value of TEP_{chl a} identified by the regression function corresponded to an N:P ratio of 26.42, diverting from this minimum the function rise up at low and high N:P values (Fig. 31. B).

The same approach was applied to the APA_{chl a} dataset. Data analysis of APA_{chl a} (Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 16.78$, $p_{\text{value}} = 1.0 \times 10^{-2}$; followed by the Conover test : mean $p_{\text{value}} = 3.0 \times 10^{-4}$) highlighted two groups : “high APA_{chl a}” corresponding to C, N, NSi enrichments and “low APA_{chl a}” corresponding to D₀, P, NP and PNSi enrichments (Fig. 31. C). When compared to the log(N:P ratio), the minimum value of APA_{chl a} of the regression function, which resembled a parabola, corresponded to an N:P ratio of 16.26, diverting from this minimum, the function rose faster at a high N:P ratio than at a low N:P ratio (Fig. 31. D).

As APA is produced by phytoplankton and prokaryotes to convert organic P into accessible inorganic P (Falkowski & Raven, 2007; Lin et al., 2016), it is used as an indicator of P limitation (Serre-Fredj et al., 2021; Tanaka et al., 2007). Enrichment without P addition (e.g., C, N and NSI) displays a higher APA value, which is in agreement with Elser & Kimmel (1986). Surprisingly, no difference was found between the D₀ value of APA and the APA measured for P, NP and PNSI enrichments. This result may contradict a potential P limitation. Even after sustaining P, APA levels may remain high due to internal storage of the alkaline phosphatase enzyme (Litchman & Nguyen, 2008).

When compared to the N:P ratio values, the increase in APA at a low N:P (i.e., N-limited) ratio can be disconcerting but has already been reported in the literature (Kuenzler & Perras, 1965). APA production can be triggered by N limitation (Kuenzler & Perras, 1965) or change as a function of the community structure (Lin et al., 2015; Yuan et al., 2017). Our results show that a high level of APA may reveal an unbalanced N:P ratio rather than being an absolute indicator of P limitation.

TEPs are indicators of carbon excretion (Claquin et al., 2008; Klein et al., 2011) and could be used as a metabolic overflow of carbon under nutrient limitation. Although Claquin et al. (2008) showed that TEPs are also produced during balanced growth, in the literature, an increase in TEP production has been reported to be associated with N

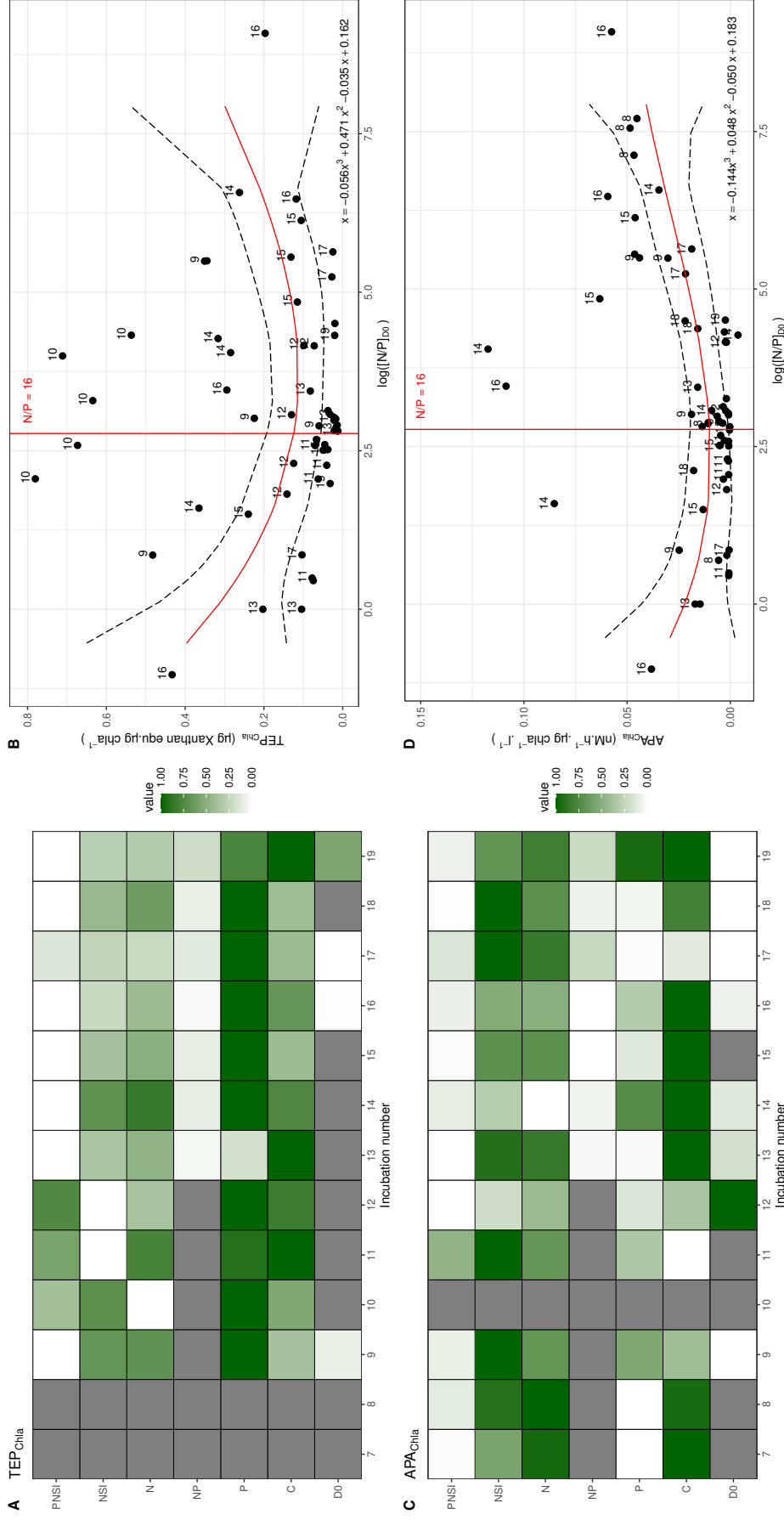


FIGURE 31 – Heatmap of normalized TEP measurement per enrichment and per incubation (A). Relationship between TEP_{Chla} and $\log N:P_{D0}$. The vertical red line represents the Redfield ratio ($N:P = 16$), and the horizontal red line represents the polynomial regression with the 95th confidence interval represented by a dashed black line (B). Heatmap of normalized APA measurement per enrichment and per incubation (C). Relationship of APA_{Chla} and $\log N:P_{D0}$. The vertical red line represents the Redfield ratio ($N:P = 16$), and the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line (B).

limitation (Beauvais et al., 2003; Corzo et al., 2000; Deng et al., 2016), with P limitation (Pandey & Pandey, 2015) and with variations in the N:P ratio (Engel et al., 2015; Mari et al., 2005). Our results are consistent with these hypotheses, suggesting that digressing from a balanced N:P ratio (i.e., N:P = 16) increases TEP production. Only the addition of at least N and P appeared to reduce TEP production. All other partial enrichments (C, N, P and NSi) increased TEP, which is consistent with the nutrient limitations of the phytoplankton community we identified in this study.

Some exceptions to this general trend were observed. During the 10th (16/09/2019) incubation, a high concentration of TEPs was associated with an N:P ratio near the Redfield ratio. High TEP concentrations are frequently observed at the end of summer due to increased phytoplankton biomass (Parinos et al., 2017; Serre-Fredj et al., 2021), and Claquin et al. (2008) showed that under balanced growth, an increase in temperature was associated with an increase in TEP production by diatoms. The high value of TEPs in the 10th incubation could be caused by a high initial stock of TEPs in the water sample because of a bloom of *Lepidodinium chlorophorum* (Serre-Fredj et al., 2021), a huge TEP producer (Claquin et al., 2008), which occurred two weeks before (Serre-Fredj et al., 2021).

The physiological response of the phytoplankton community, illustrated here by APA and TEPs, supports the hypothesis of the optimum balance of the N:P ratio of approximately 16, as the addition of balanced nutrients reduces the values of both physiological indicators. In addition, the dynamics of both indicators (APA and TEPs) confirmed the secondary role played by Si inputs in the bioassays.

3.4.3.2 Maximun quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm)

The Fv/Fm in the bioassays ranged from 0.19 to 0.62. These values display intraincubation patterns that distinguish the two groups. In 9 out of 13 incubations (70 %), complete enrichment showed the highest values among incubation, resulting in PNSI being a separate group (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 20.6$, $p_{\text{value}} = 3.8 \times 10^{-4}$, Conover : mean = 2.2×10^{-3}). In all other cases, D0 displayed the maximum value but was not significantly different from the other enrichments (Fig. 32. A). In addition to influencing the biomass or physiology of the bulk community, enrichment with a different stoichiometry affects the structure (Piehler et al., 2004), growth (Watanabe et al., 2017) and photosynthesis (Song et al., 2019) of the phytoplankton community (Serre-Fredj et al., 2021). A decrease in the maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) has been associated with many factors, including temperature (Zhang et al., 2012), parasite attacks (Park et al., 2002) and particularly nutrient limitation (Behrenfeld et al., 2004; Claquin et al., 2010). Here, the addition of both N and P increased this physiological indicator status in most cases, which is in accordance with the APA and TEP dynamics.

3.4.4 Phytoplankton community

The concentration of *Synechococcus* dropped in most incubations regardless of the enrichment. NP enrichment was still identified as a separate group (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 16.8$, $p_{\text{value}} = 7.8 \times 10^{-3}$, Conover : mean = 4.4×10^{-3}) due to the high concentration of *Synechococcus* measured in the final (from the 15th -16/06/2020 to the 19th -12/10/2020) incubations, with a maximum of 8.9×10^4 cells.cm⁻³ in the 19th incubation (Fig. 32. B).

The concentration of picoeukaryotes appeared to be affected over time, and PNSI enrichment was identified as a separate cluster due to the high concentration of this population (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 22.3$, $p_{\text{value}} = 4.0 \times 10^{-4}$, Conover : mean = 5.2×10^{-4}), as the maximum value was 1.7×10^5 cells.cm⁻³ in the 4th incubation, PNSI enrichment (Fig. 32. C). Nanoeukaryotes followed exactly the same pattern as picoeukaryotes, with PNSI enrichment identified as a separate population (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 25.2$, $p_{\text{value}} = 1.3 \times 10^{-4}$, Conover : mean = 3.6×10^{-3}). The pattern of cryptophytes was less certain, depending on the incubation, the maximum value could be reached by all enrichments, nonetheless, NP was highlighted as a separate group (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 20.0$, $p_{\text{value}} = 9.3 \times 10^{-4}$, Conover : mean NP= 4.4×10^{-3} , mean PNSI= 2.3×10^{-3}), as the *Synechococcus*-normalized value of cryptophytes was high in the final incubations (15th to 19th) (Fig. 32. E).

The concentration of microphytoplankton followed a pattern similar to that of the nanoeukaryotes, and PNSI was again identified as a separate group (Kruskal–Wallis : $\chi^2 = 25.0$, $p_{\text{value}} = 1.1 \times 10^{-4}$, Conover : mean = 5.0×10^{-4}) (Fig. 32. F). The size structure of the phytoplankton population must be taken into account, as PNSi enrichment allowed maximum growth of the picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton in most of the incubations. With the exception of the 15th and 16th incubations, *Synechococcus* seemed unable to grow in these conditions. This result could be a bias caused by the closed system, which could increase predatory pressure associated with a higher death rate of this taxon (Agawin et al., 2000b). Another possible hypothesis is that larger cells, such as diatoms, compete more successfully with high enrichment pulses than *Synechococcus* and cryptophytes (Van Meerssche & Pinckney, 2019).

3.4.5 Multivariate analysis and overall trend

Figure 33 shows the multivariate results of the last six incubations (see Section 2.4 for precision on the choice). The two dimensions of the PCA explained up to 66.3 % of the total variance and are summarized by a few statements (Fig. 33. A) : The chl *a* concentration was positively correlated with the concentration of picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton (i). APA, TEPs, RUE and the proportion of picoeukaryotes were positively intercorrelated and negatively correlated with chl *a* (ii). The proportions of microphytoplankton and nanoeukaryotes were opposite but not correlated with any of the other parameters (iii). This pinpoints a change in the phytoplankton community linked with nutrient enrichment and the N:P ratio, as limitations seem to favour populations with higher proportions of picoeukaryotes, while replete and balanced conditions favour

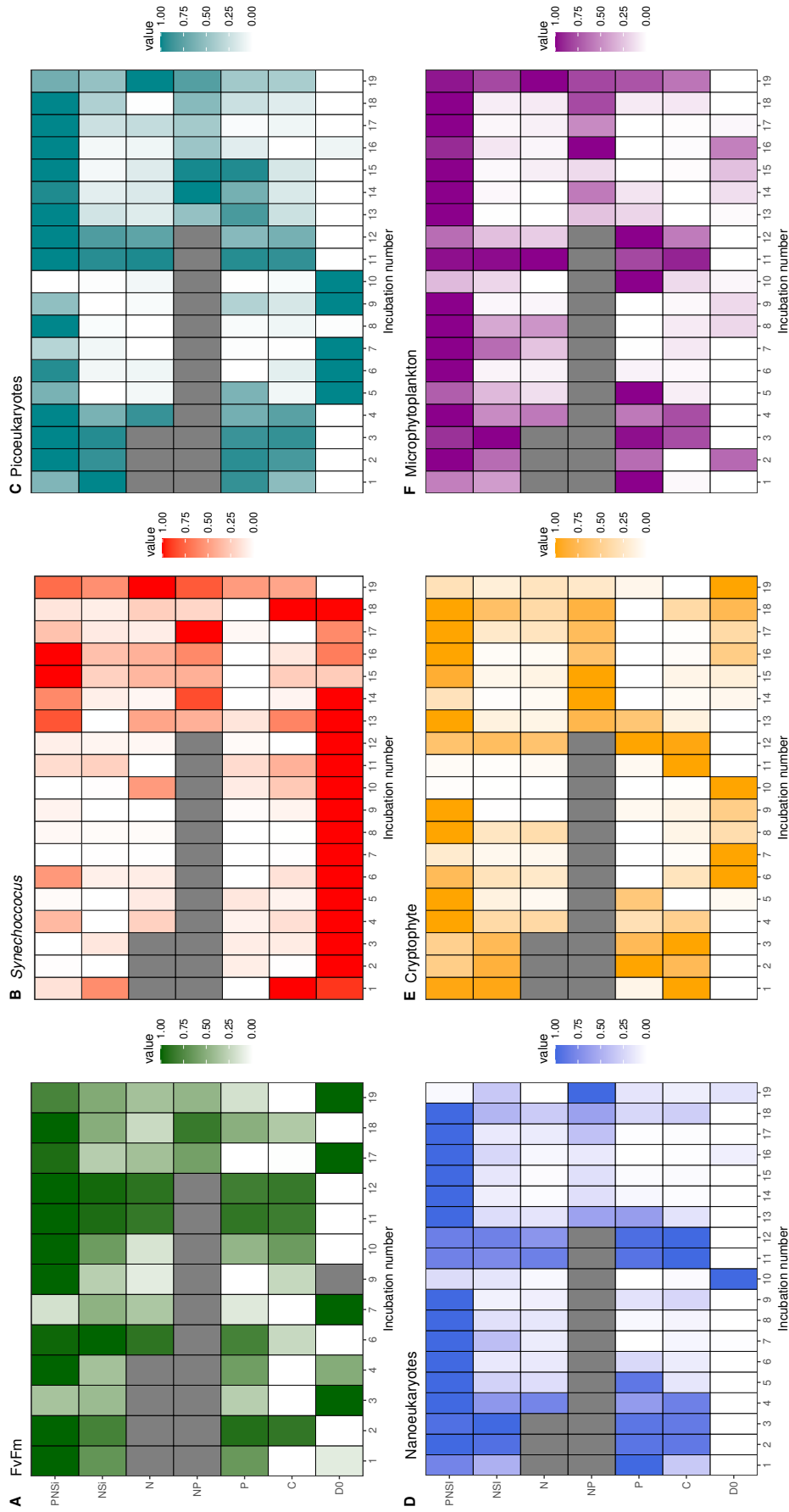


FIGURE 32 – Normalized phytoplankton communities and physiological state : maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) (A), *Synechococcus* concentration (B), Picoeukaryote concentration (C), Nanoeukaryote concentration (D), Cryptophytes concentration (E), Microphytoplankton concentration (F).

nanoeukaryote and microphytoplankton populations.

Cluster analysis identified three groups (Fig. 33. B & C) : The first group was only composed of C, N, P and NSi enrichments, the second group was composed of NP and PNSi enrichments, with the exception of P enrichment in the 13th incubation, and the last group was composed of all the enrichments in the 19th incubation already highlighted as an extreme event of massive bloom.

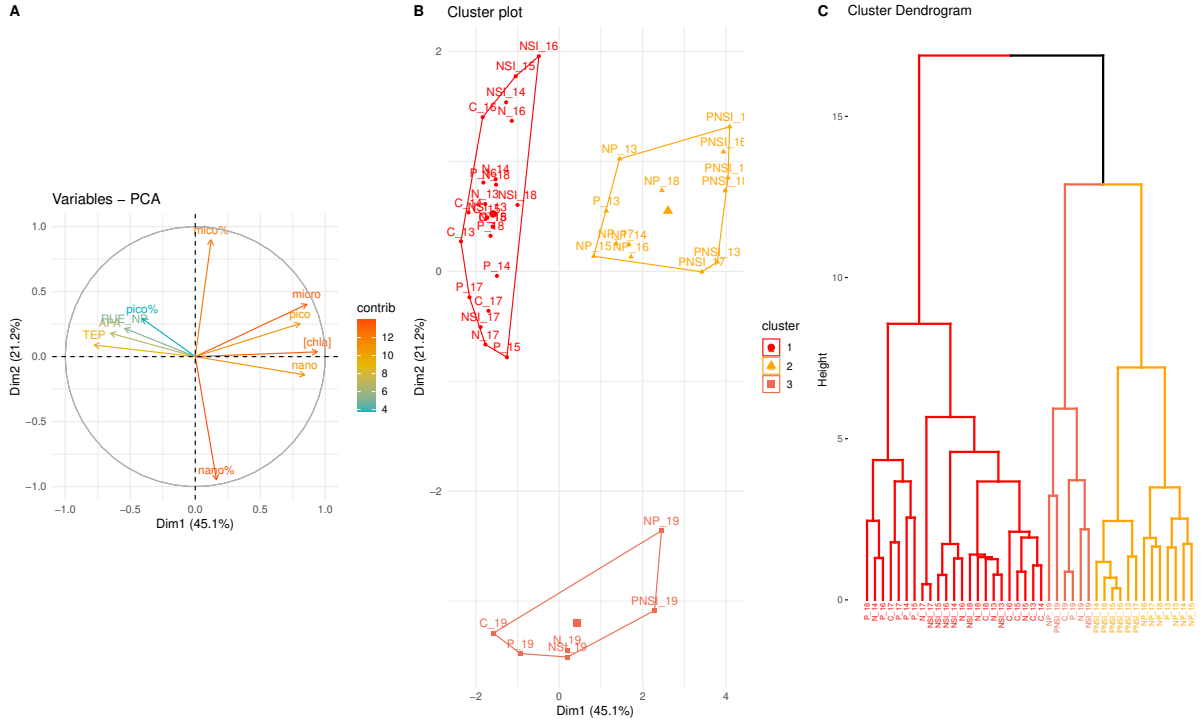


FIGURE 33 – Multivariate analysis of the last 6 incubations : Principal component analysis (PCA) with a total of 66.3 % of variance expressed with the two (A), cluster plot. The optimal number of clusters was chosen using silhouette analysis (B), cluster dendrogram (C).

3.4.6 Link between RUE and the phytoplankton community

RUE is usually calculated as chl *a* or the primary production divided by N or P (Filstrup et al., 2014; Olli et al., 2015; Ptacnik et al., 2008), but our result highlights the fact that N and P colimitation and the stoichiometry constraint summarized in the N:P ratio are important regarding the RUE (Frank et al., 2020). Moreover, both the increase in chl *a* and phytoplankton physiological parameters (TEPs and APA) suggest that the Redfield ratio is optimum for community uptake. In our case, only accounting for nutrients would have involved loss of information and an important skew due to a colimited system. The equation of RUE_{NP} we use accounts for both the quantity of nutrients by directly using the concentration and the balance of nutrients by prioritizing the limiting nutrient. This kind of model, which resembles multiple resource use efficiency (*mRUE*), could be

more effective and help understand both resource use efficiency and ecosystem production (Han et al., 2016).

The relation between RUE_{NP} and the cytometric size structure of the phytoplankton population (Figure 7) pointed out two trends : the proportion of picoeukaryotes was negatively correlated ($r^2 = 0.13$, $F = 13.7$, $p_{value} = 3.8 \times 10^{-4}$) with RUE_{NP} (Fig. 34. A), while both proportions of the largest phytoplankton classes, nanoeukaryotes ($r^2 = 0.13$, $F = 11.3$, $p_{value} = 1.2 \times 10^{-3}$) and microphytoplankton ($r^2 = 0.27$, $F = 29.2$, $p_{value} = 6.8 \times 10^{-7}$), were positively correlated with RUE_{NP} (Fig. 34. B & C).

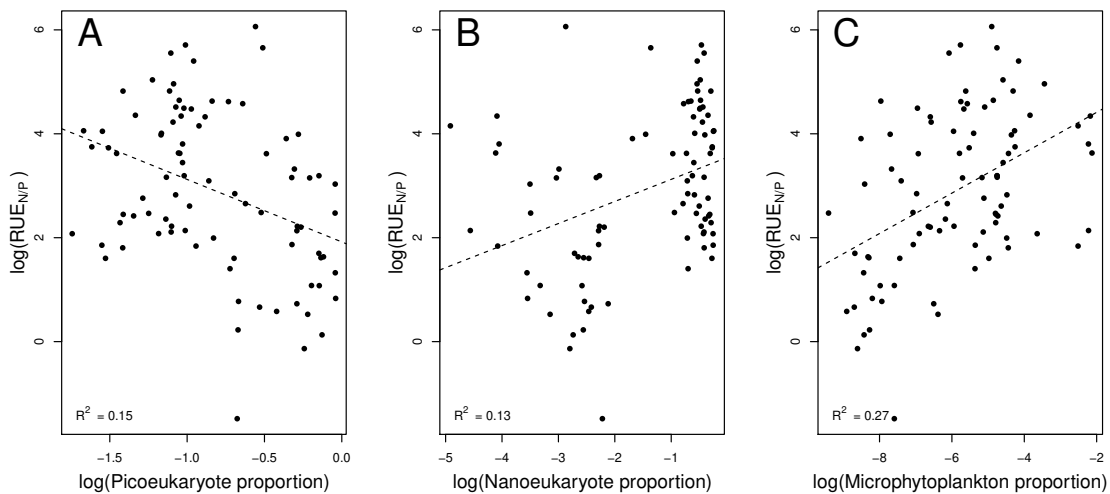


FIGURE 34 – Relationship and regression of the log of RUE_{NP} and the log of phytoplankton class contribution : picoeukaryotes (%) (A), nanoeukaryotes (%) (B), microphytoplankton (%) (C).

Concerning the RUE, we provide evidence for a relationship between size-structure groups and RUE_{NP} , where smaller classes of phytoplankton ($< 2 \mu m$) are negatively correlated and higher classes ($> 2 \mu m$) are positively correlated. RUE has been positively linked with diversity (Chai et al., 2020; Otero et al., 2020; Paczkowska et al., 2019), but to our knowledge, no information linking size structure with RUE has been reported to date. The use of size class instead of classic diversity may be more powerful, as cell size largely controls the efficiency of the nutrient uptake rate (Zaoli et al., 2019).

Furthermore, the coastal environment with rich inputs found in the Bay of Seine creates a dynamic nutrient system with nutrient pulses (e.g., inputs from local rivers). Larger cells can have 200,000 and 20,000 times more biovolume and carbon/cell volume, respectively, than smaller cells (Harrison et al., 2015), and larger cells may grow better and especially have more storage capacity, which helps them maintain a highly dynamic system (Malerba et al., 2018). Their storage capacity and luxury uptake of carbon may also render night-time nutrient uptake possible (Gardner-Dale et al., 2017), and larger cells may have even better carbon acquisition (Malerba et al., 2021). These characteristics balance the lower nutrient uptake of picoeukaryotes (Hein et al., 1995; Probyn & Pain-

ting, 1985). In this study, colimitation was observed in the incubations. The balance of a Redfield $N:P_{\text{consumed}}$ ratio has been highlighted as optimum for increased biomass of the phytoplankton population, and both APA and TEPs pointed to the same ratio needed to reduce nutrient stress. No other single resource use efficiency can fulfil these needs compared to RUE_{NP} . This study provides evidence that using stoichiometry (Frank et al., 2020) and multiple resources in resource use efficiency ($mRUE$) (Han et al., 2016) can advance our understanding of resource use efficiency and ecosystem production. Furthermore, the relationship highlighted between RUE and size community structure should help to understand and establish ecosystem trajectories as a function of management programs to reduce nutrient inputs in coastal ecosystems.

3.5 Conclusion

This study investigated the effect of nutrient composition on the growth, population structure, and physiological status of phytoplankton using bioassays. The $N:P$ ratio was shown to be the main driver of the phytoplankton community composition and physiology in the Bay of Seine, even if both a balanced (e.g., $N:P = 16$) and a nutrient stock are needed to maintain phytoplankton growth. The nutrient balance of the inputs affects both the physiological and population structure of phytoplankton. To fulfil our requirements, we proposed a new RUE_{NP} approach, which showed a correlation with the size structure of the phytoplankton community.

Acknowledgements

We thank David Lemeille, Maxime Navon, Michel Repecaud and the CREC station for technical support. This work was funded by the SMILE² and RIN ECUME projects supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie*, the European Regional Development Fund of Normandie, and *La Région Normandie* and by the PLEASE PhD project supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie* and *La Région Normandie*. Cytosense and Labstaf were co-funded by the European Union and *La Région Normandie* (FEDER/FSE 2014-2020 Manche 2021 project).

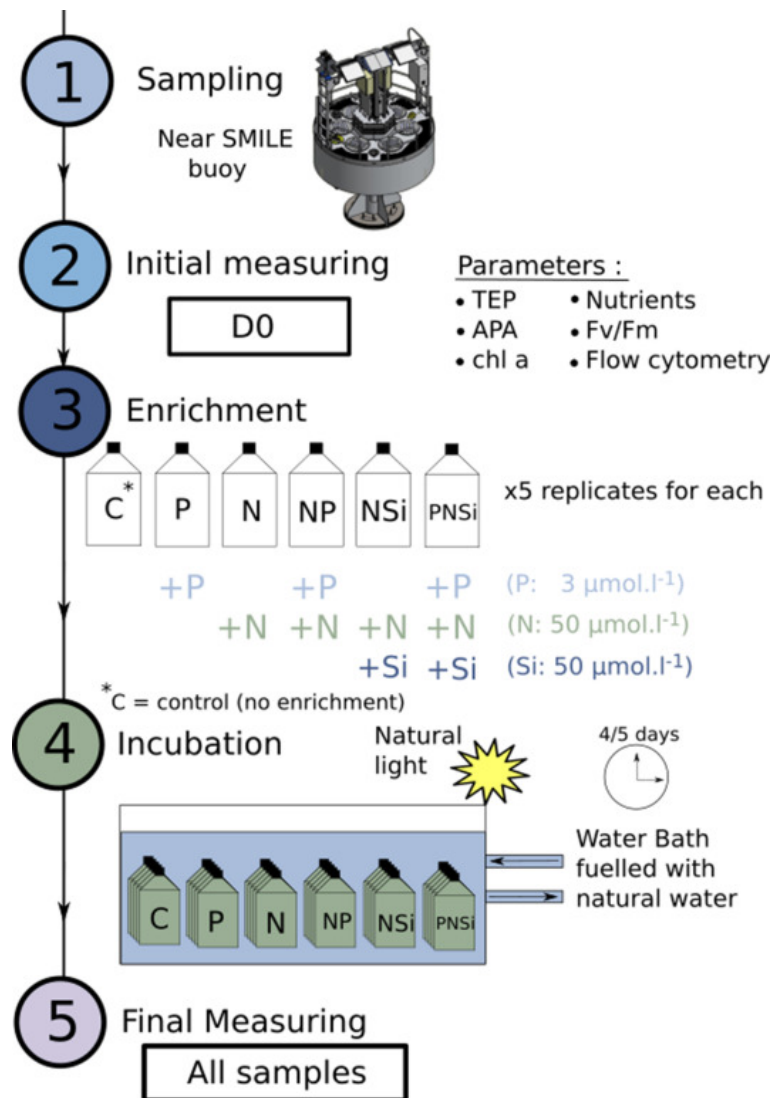


FIGURE 35 – Diagram of the experimental design.

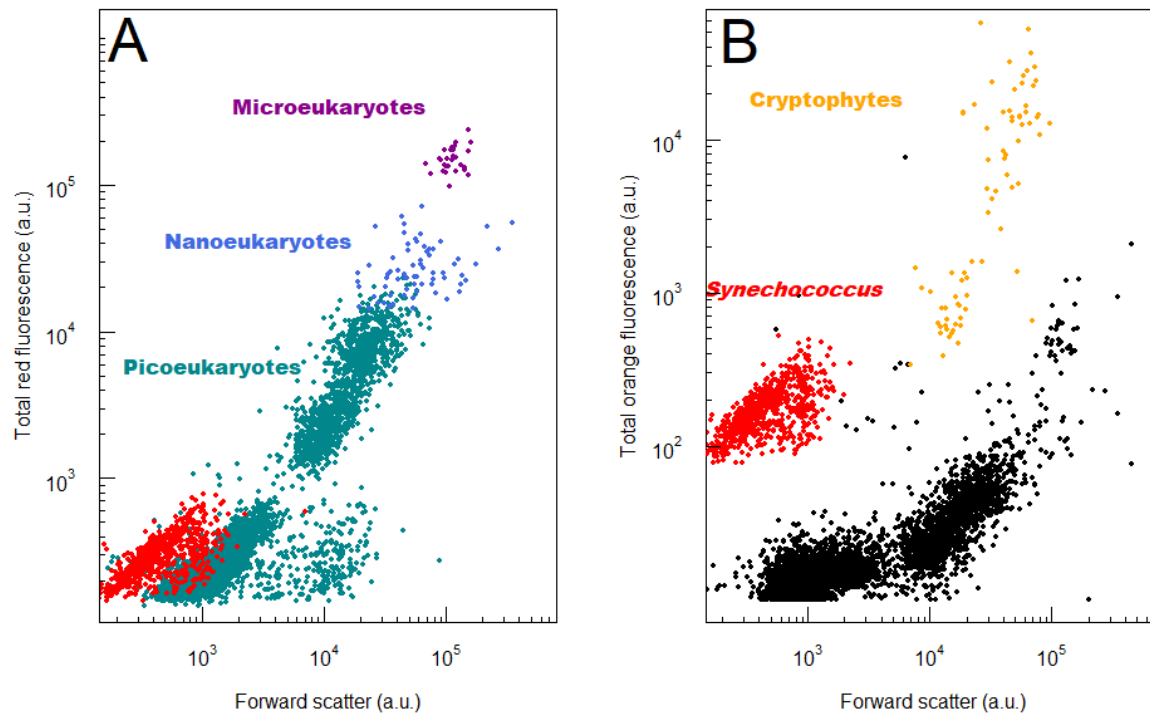


FIGURE 36 – Cytograms obtained from Cytoclus 4 (version 4.7.0.6) software of a bioassay sample analysed with CytoSense. (A) Cytogram of total red fluorescence (a.u.) vs. total forward scatter allowing identification of Picoeukaryotes and *Synechococcus* spp., Nano-eukaryotes and Microphytoplankton (B) Cytogram of total orange fluorescence (a.u) vs. total forward scatter allowing identification of *Synechococcus* spp. and Cryptophytes.

TABLE 1: Table resuming incubation. For fluorimeter type : FRRF stand for FRRf-ACT2 and STAF for LabS-TAF Blank cases indicate lack of data, while “X” mean presence.

Incubation Number	Starting Date (days)	Duration	Fluorimeter type	N	NP	APA	TEP
1	10/04/2019	5	FRRF				
2	16/04/2019	4	FRRF				
3	23/04/2019	4	PAM				
4	27/04/2019	5	PAM				
5	04/06/2019	4		X			
6	11/06/2019	4	PAM	X			
7	08/07/2019	5	PAM	X		X	
8	06/08/2019	4		X		X	
9	29/08/2019	5	FRRF	X		X	X
10	16/09/2019	5	FRRF	X			X
11	05/11/2019	4	FRRF	X		X	X
12	25/11/2019	4		X		X	X
13	19/05/2020	4		X	X	X	X
14	03/06/2020	4		X	X	X	X
15	16/06/2020	4		X	X	X	X
16	23/06/2020	4		X	X	X	X
17	27/08/2019	4	STAF	X	X	X	X
18	23/09/2019	4	STAF	X	X	X	X
19	12/10/2020	4	STAF	X	X	X	X

Chapitre 4

Facteurs de contrôle de la production et de la structure de communauté du phytoplancton en Estuaire de Seine

4.1 Résumé

L'estuaire de Seine présente une importante réduction de la concentration en P suite à la mise en place de plan de gestion visant à réduire l'effet de l'eutrophisation et amenant à une baisse remarquable de la chl *a*. Dans ce contexte, l'étude des populations phytoplanctonique est effectuée lors de transect aval-amont le long de l'estuaire entre Honfleur et Rouen. Lors de ces campagnes, les paramètres physiques, chimiques, les paramètres photosynthétiques (fluorimétrie variable) et les groupes pigmentaires (fluorimétrie multispectrale) sont mesurés à haute fréquence temporelle. De plus, sur 12 sites d'échantillonnages, des mesures des sels nutritif (N, P, Si) de chl *a* et de la structure des communautés phytoplanctoniques (cytométrie en flux) sont effectuées.

Le premier résultat est la mise en évidence d'efflorescences massives ($> 80 \mu\text{g.chl } a.l^{-1}$) qui n'avaient pas été mesurées depuis les baisses en P dans les années 2000. Les efflorescences les plus importantes sont restreintes à un tronçon particulier de l'estuaire (Duclair - La Bouille). Temporellement cette efflorescence coïncide avec les valeurs minimales de débits observés sur toute la période de l'estuaire. La spatialisation de la dynamique phytoplanctonique est en revanche plus complexe à caractériser. Pourquoi cette zone est favorable au développement d'efflorescences alors que la zone amont qui semble présenter les mêmes caractéristiques physico-chimique ne l'est pas ?

Les concentrations en sels nutritifs mesurées montrent que les nitrates sont en excès et que les efflorescences phytoplanctoniques non que peu d'impact sur les concentrations. Les concentration P bien que parfois basses ne descendent pas à des niveaux semblant être limitant pour le phytoplancton. La silice est quant à elle épuisée lors d'efflorescence, démontrant une claire limitation de ce paramètre pour la croissance des diatomées à certaines période. Néanmoins la baisse historique de la chlorophylle *a* liée à la réduction du P montre un contrôle global du compartiment phytoplanctoinque par le P. Notre hypothèse est que la dystrophie liée aux rapports N:P qui a quintuplé après la réduction du P explique cette limitation en par exemple favorisant des taxons nitrophiles présentant de faibles affinités pour le P. Cette hypothèse doit être confirmée. Le schéma spatial de la distribution des sels nutritifs n'explique pas la zonation des efflorescences qui disposent en amont d'assez de sels nutritifs pour la croissance. Les mesures de capacités photosynthétiques démontrent cependant de meilleures valeurs de production et de productivité dans cette zone au moment des efflorescences, cette zone est donc plus favorable au développement de meilleures propriétés physiologiques que la zone amont. Nous pensons que le temps de résidence doit être la clé de cette explication mais ce point doit être également confirmé car la validation de cette hypothèse n'est pas triviale.

La structure de communauté marque une succession au début de l'été avec une dominance du microphytoplancton représenté par les diatomées, les picoeucaryotes et nanoeucaryotes correspondant aux chlorophytes à la fin de l'été. La succession est contrôlée par l'épuisement de la silice nécessaire à la croissance des diatomées. Les cryptophytes sont occasionnellement présents et les cyanobactéries ne sont présentes qu'à de faibles concentrations.

La répartition de la production primaire le long de l'estuaire est fortement impactée par l'accès à la lumière, les hautes valeurs de turbidité à l'aval de l'estuaire réduisent grandement la production dans cette zone. D'après nos estimations, l'estuaire avec $33 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$ est considéré comme oligotrophe d'après la classification de Nixon.

Complex drivers of primary production along a dystrophic anthropised estuary (Seine estuary – France).

Léon Serre-Fredj^{a,b}, Léo Chasselin^{a,d}, Orianne Jolly^{a,c}, Pascal Claquin^{a,b*}

- a. Normandie Université, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
- b. Laboratoire Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, UMR CNRS 8067), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, FranceCentre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine de l'Université de Caen Normandie, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530

*Corresponding Author

Pascal Claquin

Email : pascal.claquin@unicaen.fr

Address : BOREA Laboratoire Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, UMR CNRS 8067), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France

Keywords : flow cytometry, variable fluorimetry, phytoplankton communities, multispectral fluorimetry.

Abstract

The Seine estuary is a typical model of a system in which phosphorus (P) inputs have been considerably reduced to reduce past eutrophication, with a parallel decrease in phytoplankton biomass. However, reducing P alone while high concentrations of nitrate (N) and silicate (Si) were not affected by anthropogenic changes led to a dystrophic nutrient balance in the estuary (high N:P and N:Si). To identify the drivers of primary production and phytoplankton communities in the highly anthropised Seine estuary, sampling was performed along a 110-km stretch over a period of three years. Variable photosynthetic parameters were measured with a fluorimeter and the phytoplankton community was assessed using a fluoroprobe at high space-time resolution. Using flow cytometry, biomass (chl *a*), nutrient (N, P, Si), and community structure were measured at 12 discrete locations along all the transect. Our results revealed massive blooms (chl *a* > 60 µg.l⁻¹) in a specific area of the estuary, not seen since 2002. The diatom bloom led to total depletion of Si, but no clear limitation of P was observed. Nevertheless, the decrease in P appears to have played a key role by triggering a succession from diatoms (microphytoplankton) to chlorophytes (nanophytoplankton) and hence affecting phytoplankton composition. None of the variables measured explained the particular location of the blooms in the estuary and the absence of higher phytoplankton biomass upstream. Only phytoplankton production and productivity indicators were higher in this specific zone. Overall, the reduction in P inputs appears to have reduced eutrophication, but also affected phytoplankton communities and succession dynamics. Furthermore, once integrated, the main driver of the phytoplankton primary production is access to light access, which is strongly influenced by turbidity.

4.2 Introduction

Estuaries are highly dynamic systems at the interface of freshwater and marine systems. They provide important ecosystem services including supplying and cycling nutrients (Basset et al., 2013), recreational facilities, water purification (Daniell et al., 2020), fisheries O'Higgins et al. (2010), estuaries also play a role in carbon cycling (Chen & Borges, 2009), and the decline of these ecosystems will affect these services (Barbier et al., 2011). A major cause of the observed decline in estuaries is eutrophication (Rabalais et al., 2009), defined as an aquatic ecosystem associated with overproduction of organic matter due to human-induced inputs of nitrogen (N) and phosphorus (P) (Pannard et al., 2017). These inputs affect both the concentration of nutrients and their stoichiometry (Martin et al., 2008; Watanabe et al., 2017). Nutrient concentrations and the stoichiometry ratio are two of the main drivers of the phytoplankton community in estuaries (Chu et al., 2014; Kocum et al., 2002b). As phytoplankton sustain all higher trophic levels through primary production there is a need to deepen our knowledge of the factors that control the phytoplankton community and primary production. In addition to nutrients, many other divers affect primary production in estuaries : light access and turbidity (Kocum et al., 2002a; Kromkamp et al., 1995; Liu et al., 2018), temperature (Kristiana et al., 2012), river flow (Kristiana et al., 2012; Maier et al., 2012), residence time (Raimonet et al., 2018; Stumpner et al., 2020) and grazing (Kimmerer & Thompson, 2014; Quinlan et al., 2009; Sautour et al., 2000). Recently, due to management policies, most European rivers/estuaries have reversed eutrophication by reducing P and thus increased the N:P ratio (Ibáñez & Peñuelas, 2019; Penuelas et al., 2020; Peñuelas et al., 2013; Westphal et al., 2020).

The Seine estuary is a typical example of human-affected ecosystems where nutrient inputs from the watershed increased drastically over several decades led to eutrophication before management policies were applied (Billen et al., 2007). Efforts to reduce eutrophication partly succeeded by reducing phosphorus inputs (Romero et al., 2016), but consequently led to high N:P and $Si:P$ ratios in the estuary (Supplementary Figure 45). Although environmental concerns focus on the management of this estuary, and even though this ecosystem compartment is important for ecological and eutrophication assessment (Garnier et al., 2007; Pinckney et al., 2001), the dynamics of the phytoplankton community and primary production are poorly documented (Garnier et al., 1995, 2018; Morelle et al., 2018).

Primary production needs to be measured to characterise the functioning and eutrophication of a given system (Cloern et al., 2014; Nixon, 1995). Fluorimetry methods including single turnover active chlorophyll fluorimetry (Boatman et al., 2019; Kromkamp & Forster, 2003), which allows high frequency measurement of photosynthetic parameters, are better suited to estimate the primary production of such dynamic systems than traditional carbon isotope (^{14}C or ^{13}C) methods (Babin et al., 1994). Morelle et al. (2018) combined variable fluorimetry and carbon incorporation in the downstream part of the Seine estuary and found a good correlation between estimations made with both methods,

thereby supporting the use of fluorimetry. To study the impact of changes in nutrient inputs on primary production in the Seine estuary, sampling campaigns were conducted along a 110- km transect over a period of three years. High frequency measurements of photosynthetic parameters and environmental parameters were performed to improve our knowledge of the estuary at the spatial scale. We combined this approach with discrete sampling along the transect of phytoplankton community structure using flow cytometry and nutrient to assess potential changes in the phytoplankton community and limitation patterns.

The specific objectives of our study were to :

- 1) Investigate the effect of the dystrophy on the phytoplankton community ;
- 2) Assess potential spatial discrepancy in primary production ;
- 3) Identify the drivers of primary production in this highly anthropised estuary.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Estuary transect & sampling strategy

Kilometric point (Kp) measurement is usually used in the Seine estuary to measure the distance from a spatial point on the River Seine to Paris following the path of the river. Measurements were made on 13 daily cruises (12/03/2019 - 12/07/2021) between Honfleur (49°25'45" N 0°13'50.00" E- Kp : 355) and Rouen (49°26'33" N 1°4'15.00" - Kp : 246), a 110-km transect (Figure 37). The cruise was scheduled to follow the rising tide to avoid a bias due to changes in water masses. For sampling, a diaphragm pump (UF0812 - Whale, UK) was used continuously along the cruising path. At 8-minute intervals, measurements were made of physical parameters (temperature, salinity, oxygen, turbidity) with a multi-parameter probe (YSI 6600, YSI, USA), of multispectral fluorescence with a fluoroprobe (BBE - Moldaenke), NO₃⁻ with a OPUS (TriOS Mess- & Datentechnik GmbH Germany), PAR (RBR solo³ PAR), and of photosynthetic parameters with a FRRf (Chelsea Technologies, UK or a Labstaf. (Chelsea Technologies, UK). Discrete samples were also taken at 12 sites along the transect (see Figure 37). Chl *a*, inorganic nutrients (NO₃⁻, PO₄³⁻, Si(OH)₄), phytoplankton community were measured using flow cytometry, and alkaline phosphatase activity was also measured in the water samples. All transect date and measurements are summarised in the supplementary table.

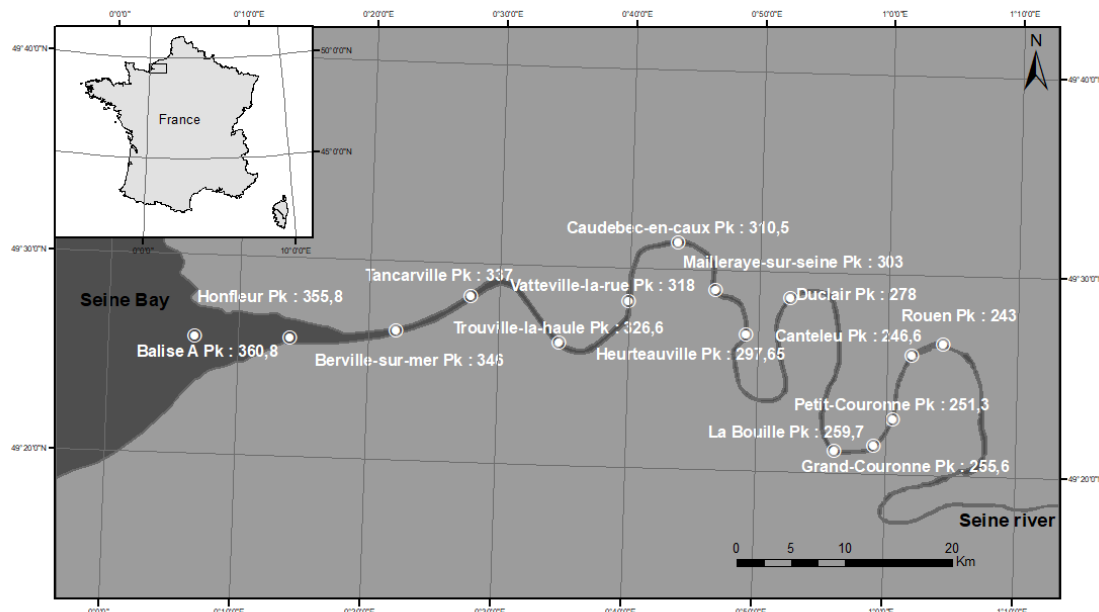


FIGURE 37 – Seine Estuary map : White point display sampling station with associated Kp value.

4.3.2 Fixed point high frequency data : oxygen and flow

Flow rate measurements (M.s^{-3}) for the River Seine made at Vernon, a station located upstream from our study area, were taken from the HYDRO database (<https://www.hydro.eaufrance.fr>). High frequency oxygen data monitored at four stations (Kp : 245, 265, 337, 355) were provided by the Synapses monitoring network (<https://www.seine-aval.fr/synapses/>).

4.3.3 High frequency photosynthetic measurements

Fluorescent light curves (FLCs) were measured using FRRf-ACT2 or LabSTAF. The samples were analysed after a 5-min period of dark incubation for oxidation of quinone A (Q_A). At the end of the dark period F_O (minimum fluorescence) was measured using weak non-actinic light.

For the ACT2-FRRF measurements, a single turnover (ST) saturation phase was delivered with one hundred 1- μs flashlets at 2- μs intervals to measure minimum (F_O) and maximum (F_m) fluorescence (452 nm) using the biophysical model of (Kolber et al., 1988).

For the LabSTAF measurements, a single turnover (ST) saturation phase was delivered with a solid 100- μs flash (450 nm) to measure minimum and maximum fluorescence, as described in Boatman et al. (2019). The maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) was calculated as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_O)}{F_m}$$

Samples were then exposed to 10 light steps of increasing PAR (from 0 to 2,000 $\mu\text{mol photon.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) for 30-sec each step. The effective quantum efficiency of PSII ($F_{q'}/F_{m'}$) was measured at each light step as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_{q'}}{F_{m'}} = \frac{(F_{m'} - F')}{F_{m'}}$$

where $F_{m'}$ is the maximum fluorescence under light and F' is the steady state fluorescence under light.

The relative electron transport rate (rETR, relative unit) was calculated for each irradiance (E) as :

$$\text{rETR}(E) = \frac{F_{q'}}{F_{m'}} \times E$$

The maximum relative electron transport rate (rETR_{max}) was estimated by fitting the FLC data to the model of Webb et al. (1974) modified by Boatman et al. (2019) using ACT2RUN and RunSTAF (Chelsea Technologies, UK) software to estimate α and E_k with α , the initial slope of the FLC, and E_k the light saturation index :

rETR_{max} was calculated as :

$$rETR_{max} = \alpha \cdot E_k \quad (17)$$

Using the absorption algorithm of Oxborough et al. (2012), the PSII electrons flux per unit volume was calculated as follows :

$$a_{LHII} = \frac{F_m \cdot F_o}{F_m - F_o} \cdot K_c \quad (18)$$

where K_c is an inherent constant of the FRRf. The maximum PSII flux per unit volume ($JVII_{max}$) was calculated as :

$$JV_{PSII}(E) = a_{LHII} \cdot rETR(E) \cdot 3600 \cdot 10^{-6} \quad (19)$$

where $JVII_{max}$ is expressed in $mmol\ e^- \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$

The electron transport rate ($ETRII_{max}$) was calculated as :

$$ETRII_{max}(E) = JVII \cdot [chl a]^{-1} \quad (20)$$

where $[chl\ a]_F$ is the concentration of $[chl\ a]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$) estimated from a calibrated value of F_0 . At each cruise a linear relationship ($[chl\ a]_{ext} = xF_0 + b$) was established between extracted $[chl\ a]$ measured at each of the 13 discrete sampling sites. The relationships were always significant with mostly high R^2 (between 0,33 and 0,92, mean = 0,65), the low values correspond to the low chl a transect in winter. $ETRII_{max}$ is expressed in $mmol\ e^- \cdot mg\ chl a^{-1} \cdot h^{-1}$

4.3.4 Integrating primary production

Phytoplankton primary production (PPP) was integrated according to time (t), depth (z) and surface (s) to calculate phytoplankton gross primary production along the estuary. Integration covered the period from the 12th of March 2019 to the 16th of March 2021 (735 days $\approx$ 2 years) to avoid seasonal bias :

$$PPP = \int_0^{735days} \int_{z=0}^{Z_{eu}} \int_{Kp=246}^{Kp=355} JV_{II}(E_{z,t,z,s}) / \Phi_{e,c} \quad dt \quad dz \quad ds \quad (21)$$

E_z (PAR at depth z) was calculated using the Beer-Lambert law to a euphotic depth (Z_{eu} , depth where only 1 % of surface PAR remains) was reached :

$$E_z = E_0 \cdot e^{-k_d \cdot z} \quad (22)$$

where E_0 is the surface PAR, and k_d the light attenuation coefficient calculated from a regression using turbidity from Morelle et al. (2018). Light data were provided by the nearest weather station (located 45 km from the study area).

To convert PSII flux par unit volume $JVII(E)$ into carbon production, an electron requirement for carbon fixation ($\phi_{e,c}$) of 8 was used (Morelle et al., 2018).

4.3.5 Flow cytometry

Unfixed samples were analysed in the evening of the day the samples were collected with the CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherland) equipped with a blue laser (488 nm, 50 mW) and a green laser (552 nm, 50 mW). This produces pulse shapes based on the inherent optical properties of the particle when they cross the laser : sideward angle scatter (SWS), forward scatter (FWS), red (FLR, 668-734 nm), orange (FLO, 601-668 nm) and yellow fluorescence (FLY, 536-601 nm). The threshold was set at 16 mV to reduce acquisition of data on non-photosynthetic particles triggered on FLR, for each sample, 380 μ L were analysed with a speed of 2.0 μ L.s⁻¹. The CytoSense can analyse chains, cells, or colonies between 1 and 800 μ m in diameter, microspheres of 1.0 μ m yellow-green fluorescent, FluoSpheres®) and 1.6 μ m (non-fluorescent, provided by Cytobuoy) and 2 μ m, 6 μ m, 10 μ m, 20 μ m (Fluoresbrite® YG microsphere, Polyscience) were used to calibrate size recording.

To distinguish the phytoplankton, five clusters were determined using the cells' optical properties and attributed to cyanobacteria (corresponding to *Synechococcus*-like), picoeukaryotes, nanoeukaryotes, microphytoplankton and Cryptophytes. The cyanobacteria cluster has the smallest FWS signal and a high orange fluorescence (FLO) signal, which matches very small cells with a high concentration of phycoerythrin. Nano-eukaryotes and microphytoplankton cells were differentiated from pico-eukaryote cells using the amplitude of the FLR signal and the bead signal. Cryptophyte clusters have higher FLO than cyanobacteria due to the high concentrations of phycoerythrin in their cells and an FWS equivalent to nano-eukaryotes and microphytoplankton cells (Olson et al., 1989; Thyssen et al., 2014). For technical reasons, cytometric analyses were only performed after the 9th of June 2020 transect.

4.3.6 Measurement of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)

Water samples were collected and filtered through a cellulose acetate filter (ClearLine, CA, 33 mm, 0.45 μ m) in 50-ml falcon tubes and immediately frozen (-20 °C), with the exception of Si(OH)_4 which was stored at 4 °C. Analyses were conducted using a Seal Analytical AA-3 system (Aminot & Kérouel, 2007). The limits of quantifications were 0.02 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for PO_4^{3-} and 0.05 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for NO_3^- , NO_2^- , Si(OH)_4 . The OPUS UV is a spectral sensor equipped with a xenon flash lamp as light source and a high-end miniature spectrometer (MMS, Zeiss, Germany) with 256 channels covering the spectral range from 200 to 360 nm as detector. This sensor measures NO_3^- at high frequency with low energy consumption. A 20-mm optical path allowed measurements from 1 to 357 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ with a precision of 0.18 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.3.7 Chlorophyll-a measurements

Water samples (100 - 250 ml, depending on the turbidity) were filtered through a glass-fibre filter (Whatman, GF/F, 47 mm) and immediately frozen (-20 °C) until analysis. Ten

ml of 90 % acetone (v/v) were added to extract the pigment and the samples were then left in the dark at 4 °C for 12 h. After being centrifuged twice for 5 min at 1,700 g, the Chl *a* concentration of the extracts was measured using a Trilogy fluorimeter (Turner Designs, Sunnyvale, USA) according to the method of Strickland & Parsons (1972). The relationship between the concentration of Chl *a* and F_0 was established, thereby allowing the F_0 value to be converted into Chl *a* concentration.

4.3.8 Statistical and data analysis

Analyses were conducted using R software (R-project, CRAN) version 3.6.1. Partial triadic analysis (PTA) was performed using the PTA function in the “ade4” package to study a set of sub-matrices depicting the parameters measured. Only the inter-structure displaying the variation of parameter in space and over time is shown, the compromise data were used to cluster measurement stations. Clustering was performed using the “FactoMineR” (Lê et al., 2008) package. The number of clusters for the k-means cluster analysis was chosen using silhouette analysis. The optimal number of clusters displaying poor complexity is two, but three clusters are shown to provide more information.

4.3.9 Environmental parameters & eutrophication effect

High frequency measurements of river flow and oxygen taken by the monitoring network throughout the estuary made it possible to place our samples in the dynamics of the whole estuary (Fig. 38). The river flow has a typical seasonal pattern with higher flow in winter and lower flow in spring/summer. A minimum of $114 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ was measured in September 2019, and a maximum of $1,940 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ in February 2021 (Fig 38. A). The same general trend was found for dissolved oxygen, but at a smaller scale, some discrepancy was found among the monitoring stations. The lowest value of dissolved oxygen recorded was $0.7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (10/07/2019) at Fatouville (Kp : 344) a downstream station where the maximum turbidity zone (MTZ) was found (Fig 38.B).

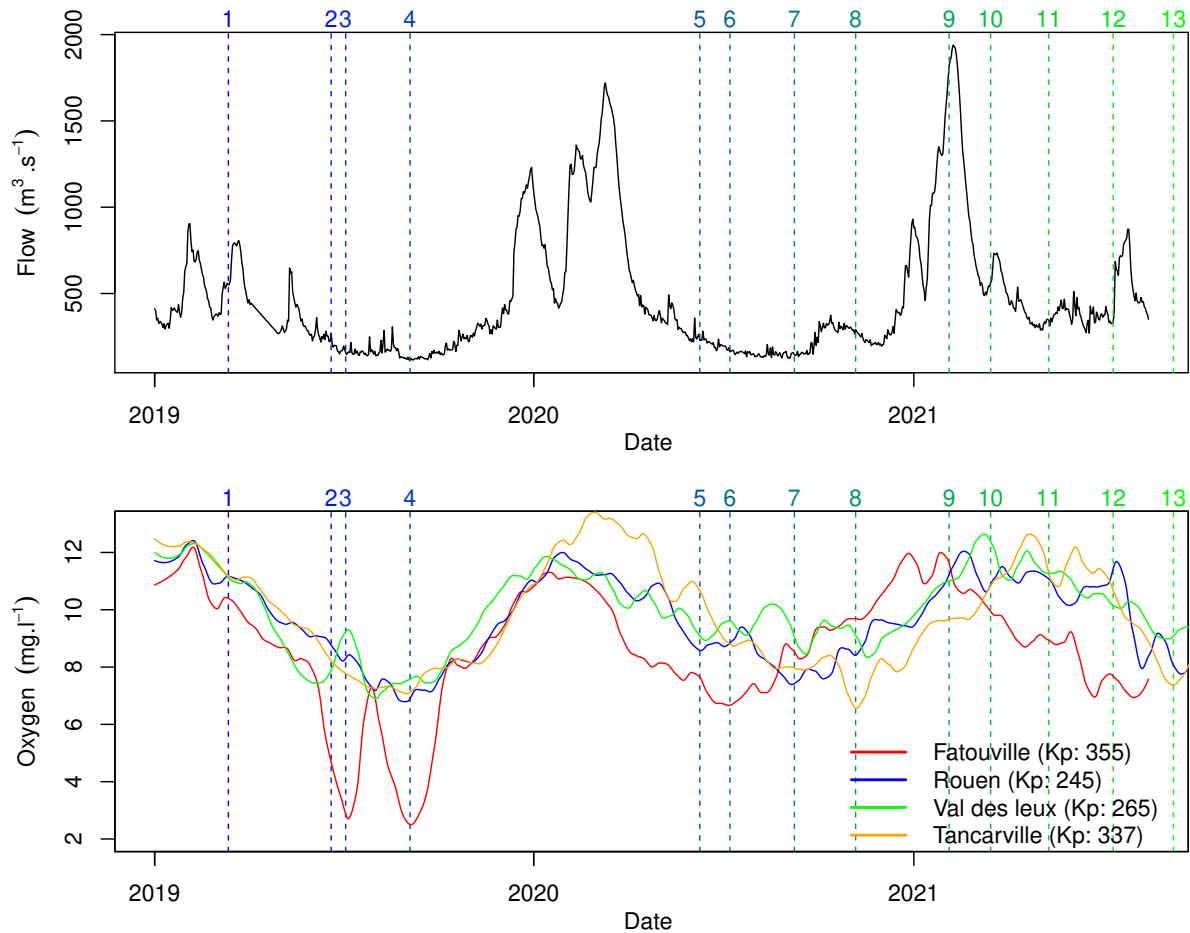


FIGURE 38 – Estuary high frequency temporal data : River flow ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) (Top), Dissolved oxygen ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) (Bottom), colored dotted vertical lines display the date of each campaign.

The temperatures measured during the sampling campaigns followed seasonal pattern and ranged from 7.7°C on the 4th of February, 2021, to 24.0°C on the 4th of July, 2019 with almost no spatial variation along each transect (Supplementary figure 46). Turbidity showed high spatial variability, ranging from 2.3 to 200 NTU with high values generally concentrated in the last downstream 30 km of the estuary (from Kp 355 to 326) except in

the February 2021 transect, when a mean of 60.4 ± 10.7 NTU was measured (Fig 39.A). Chl *a* concentrations also showed seasonal variations with a maximum value of $89.2 \mu\text{g chl } a \cdot \text{l}^{-1}$ in July 2020 (Kp : 278). Other significantly high values were observed along the gradient, with, for example $>60 \mu\text{g chl } a$ between Kp 326 and 297 in July 2019 (Fig 39.B). It is important to note that such high chl *a* values have not been observed in the estuary for the last 20 years. Oxygen saturation display seasonal variation with peak ($> 110 \%$) observed in July 2019 and 2020 between Kp 259 and 278 (Fig 39.C).

4.3.10 Nutrient excess and dystrophy

All inorganic nutrients measured along the transect reflected seasonal variations due to variations in flow and repletion from the watershed in autumn and winter. Nitrate values never fell below $88.9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ and reached a maximum value of $516 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fig 39.D) with an overall mean value of $380.5 \pm 67 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Silica content reached $200 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ with a mean of $111 \pm 49 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ but three events with very low values were recorded : in September 2019, values under $9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ were observed above Kp 326 (i), in July 2020 between Kp 278 and 355 with a minimum of $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ii), and along the entire transect in May 2021, with a mean of $43.6 \pm 10.9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (iii) (Fig 39. E). Phosphate values ranged from 0.02 to $7.70 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ and only reached critical levels in the upper and lower part of the estuary in September 2020 after the Kp 320 with $< 0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ at Kp 251 and 330 (Fig 39.F). To summarise, only silicate and phosphate displayed depletion values while nitrate did not come close to depletion. The mean Si:P and Si:N ratios for all our data were respectively 39 and 0.3, while the mean N:P ratio was 157.

4.3.11 Phytoplankton diversity

Phytoplankton diversity was assessed using two types of indicators : cytometric population and multispectral groups. For cytometric groups : cryptophytes content reached high values ($> 1.0 \cdot 10^3 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$) in May 2021 at multiple sampling points, but with a drop in concentration near the bay compared with a maximum value of $641 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ at Kp 251 on the 8th of July 2020 (Fig 40.A). The concentration of picoeukaryotes reached $6.1 \cdot 10^4$ in July 2021 (Kp 251) and $1.6 \cdot 10^4$ in July 2020 (Kp 246), there was a general trend with higher values between Kp 265 and 246 (Fig 40.B). High concentrations of nanoeukaryotes were spatially rarer with the highest values measured at Kp 265 and 318 with, respectively, $4.9 \cdot 10^3$ and $4.4 \cdot 10^3$, in September 2020 and July 2021 (Fig 40.C). Maximum microphytoplankton values were measured at Kp 297 and Kp 259, with respective values of $7.0 \cdot 10^2$ and $6.9 \cdot 10^2$ in July 2020 and May 2021 (Fig 40.D), a population belonging to the *Cyclotella* genus was identified in the picture taken by the flow cytometer in July 2020. Cyanobacteria were present at very low concentrations (e.g. less than $400 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$) except for the June 2021 and July 2021 transects, when values reached respectively, 3,000 and $4,921 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ in the upper part of the estuary (data not shown).

In multispectral groups, the phytoplankton community was dominated by two major pigment groups : chromophytes and phycoerythrin. Chromophytes dominated the com-

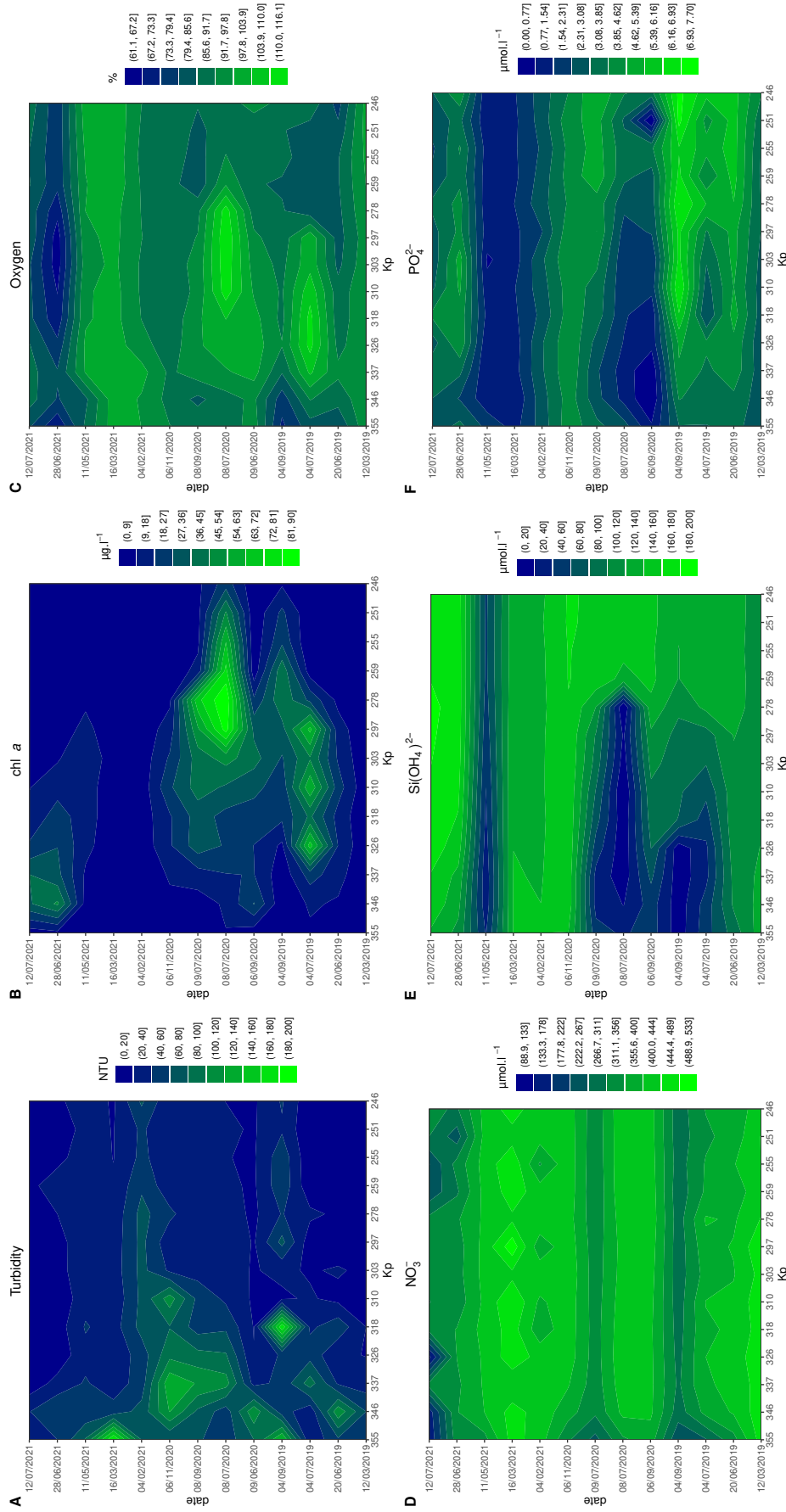


FIGURE 39 – Spatiotemporal environmental parameter patterns measured in the Seine estuary between March 2019 and July 2021 : Turbidity (NTU) (A), chl a concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) (B), oxygen saturation (%) (C), Nitrate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (D), Silicate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (E), Phosphate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (F), Kp (kilometre point).

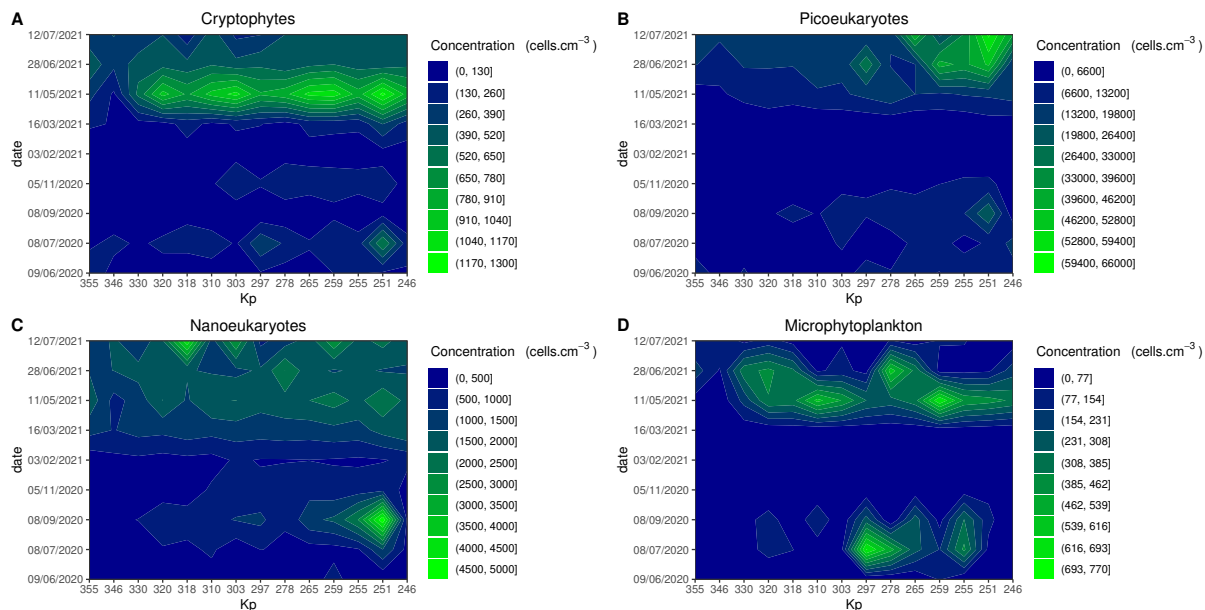


FIGURE 40 – Spatiotemporal structure patterns of phytoplankton communities measured by flow cytometry in the Seine estuary between June 2020 and July 2021 : Cryptophytes concentration (cells.cm⁻³) (A), Picoeukaryotes concentration (cells.cm⁻³) (B), Nanoeukaryotes concentration (cells.cm⁻³) (C), Microphytoplankton concentration (cells.cm⁻³) (D). Kp (kilometre point).

munity during the productive period (spring and summer) (Fig 41.B), while the phycoerythrin group dominated during the unproductive period (winter and autumn) (Fig 41.C) and both displayed a clear spatial pattern. Lastly, dominance by the chlorophyte and phycocyanin groups displayed both temporal and spatial patchiness (Fig 41. A and D). The upstream area between Kp 259 and Kp 246 presented a particular shifting dominance pattern. In this zone, each of the four pigments groups achieved dominance for a short period : June 2021 for chlorophytes, July 2019 chromophytes, November 2020 for the phycoerythrin group, and June 2019 for the phycocyanin group, whereas other areas displayed less diversity and were mainly dominated by phycoerythrin and chromophytes.

4.3.12 Photosynthetic parameters & primary production pattern

The maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) ranged from 0.05 to 0.6, values under 0.2 indicated the presence of dead cells or cells whose physiological status was poor. Variations in this parameter followed a seasonal pattern with maximum values recorded in July and minimum values in winter (Fig 42.A). Variation in the α_{II} parameter showed the same annual variation as the Fv/Fm, but with more spatial variation (Fig 42.B).

The primary production indicator (JV_{IImax}) was very frequently high in the zone between Kp 304 and Kp 279 with a maximum value of 36.5 mmol e⁻.m⁻³.h⁻¹ on the 4th of July 2019 at Kp 364, on the 9th of June 2020, the 8th of July 2020 and the 8th of August 2020,

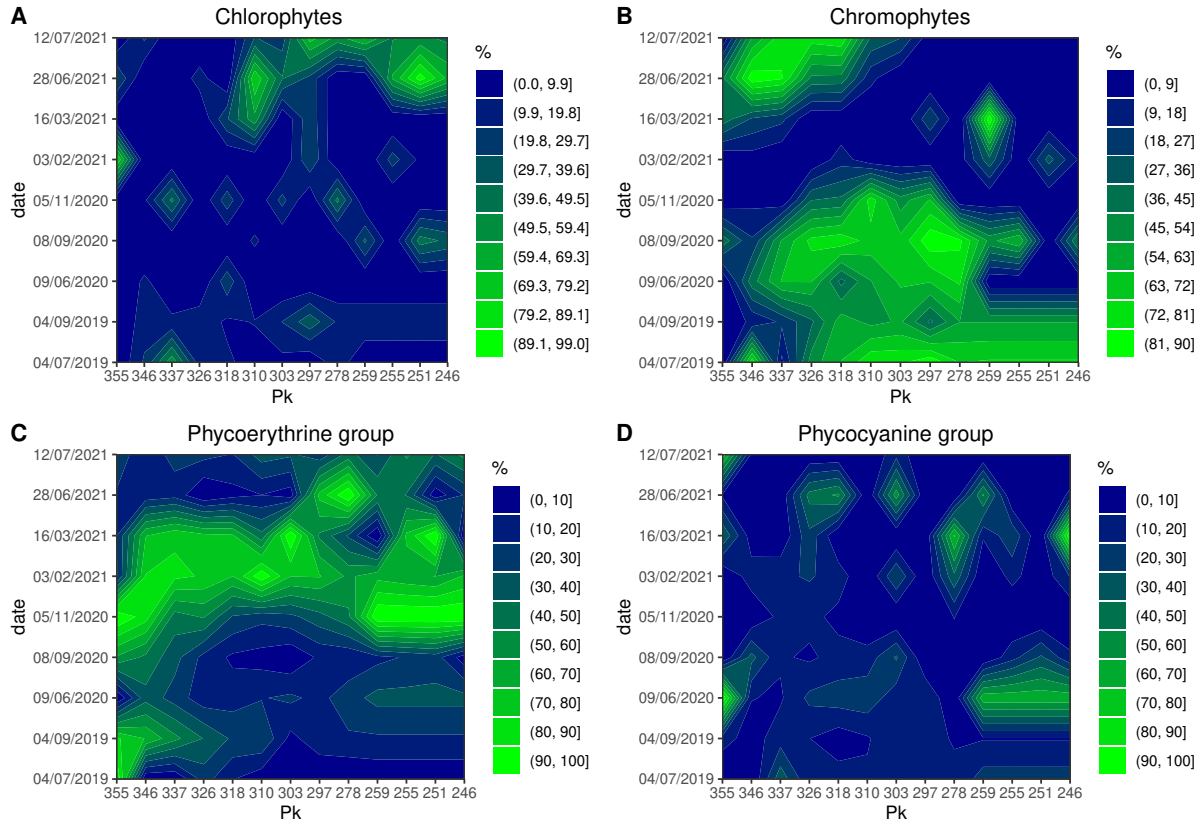


FIGURE 41 – Spatiotemporal structure patterns of phytoplankton communities measured by multispectral fluorometer in the Seine estuary between July 2019 and July 2021 : Chlorophytes (%) (A), Chromophytes concentration (%) (B), Phycoerythrine group (%) (C), Phycocyanine group (%) (D). Kp (kilometre point).

the transects all displayed high values ($> 20 \text{ mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) (Fig 42.C). As biomass is a component of production ($\text{JV}_{\text{I}_{\text{max}}}$) the high production values are consequently associated with similarly high biomass values. This type of pattern was also found in other areas, such as between Pk 354 and Pk 344, with a mean of $8.25 \text{ mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ in June 2021. However, with the exception of the area between Kp 304 and Kp 279 between the 9th of June, 2020 and the 9th of September, 2020, when both productivity ($\text{ETR}_{\text{I}_{\text{max}}}$) and production were high, with a mean value of $17.00 \text{ mmol e}^- \cdot \text{mg chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ between Kp 309 and Kp 274 (Fig 42.D), we observed decoupling between production and productivity. Therefore, that fact that the area between Kp 304 and Kp 279 displayed both high production and productivity appeared special.

PTA analysis highlighted a particular pattern in which all the photosynthetic parameters (α , E_k , $\text{JV}_{\text{I}_{\text{max}}}$, $\text{ETR}_{\text{I}_{\text{max}}}$) and the biomass indicator ($\text{chl } a$) were highly correlated and formed a group that displayed a low correlation with most of the other variables with the exception of the nutrient ratio (N:P, N:Si) (Fig 43.A). The clustering of the compromise displays a spatial gradient in which the three groups represent the upstream, center and low stream zone of the estuary. One of the clusters (in blue) matches the high productivity area (Fig 43.B).

4. Facteurs de contrôle de la production et de la structure de communauté du phytoplancton en Estuaire de Seine

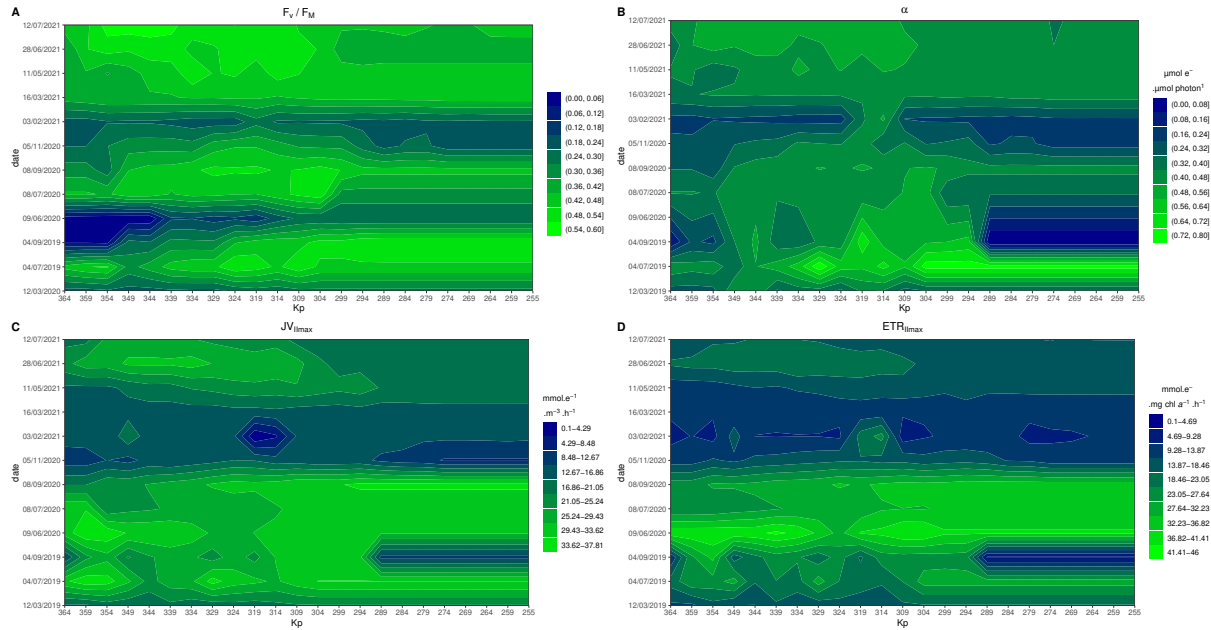


FIGURE 42 – Spatiotemporal patterns of photosynthetic parameters measured in the Seine estuary between July 2019 and July 2021 : Fv/Fm (A), α ($\mu\text{mol e}^- \cdot \mu\text{mol photon}^{-1}$) (B), JvIImax ($\text{mmol e}^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) (C), ETRIImax ($\text{mmol e}^- \cdot \text{mg chl a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (C), JvIImax and ETRIImax. values have been logged for visual display, unlogged value are display by the scale. Kp (kilometre point).

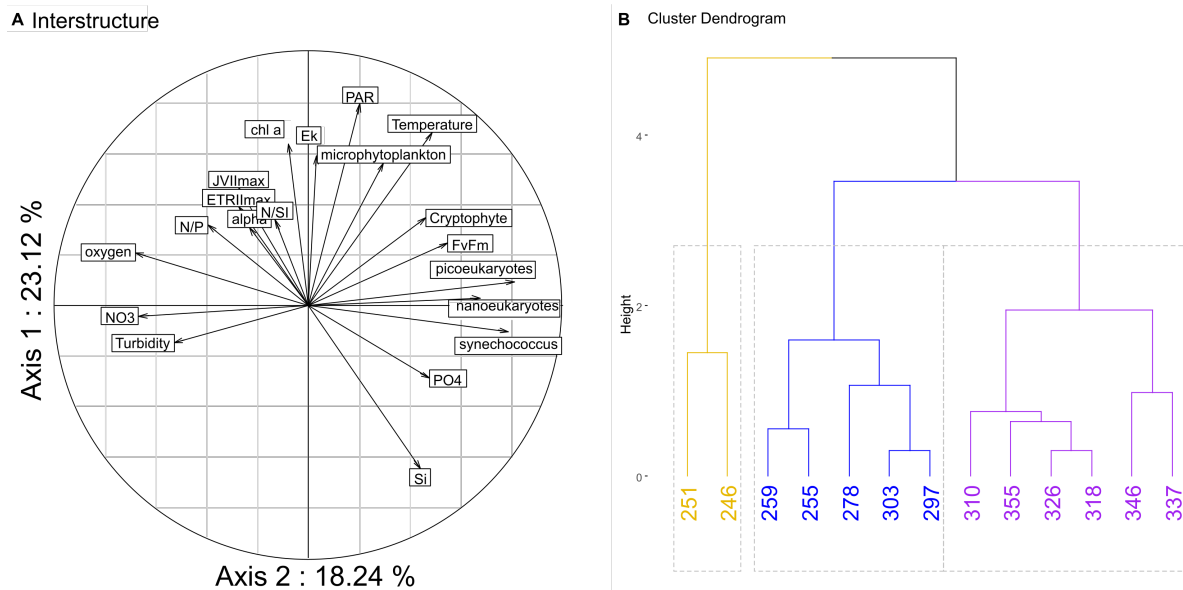


FIGURE 43 – Multivariate analysis : Interstructure of the Partial Triadic Analysis (PTA) with a total of 41.4 % of variance expressed with the two axes (A), cluster plot, the optimal number of cluster was 2 we choose to display 3 to show more complexity (B)

Finally, using light and turbidity and the photosynthetic parameter estimated with variable fluorimetry, we integrated daily mean production in the water column at a yearly

scale, which revealed a high production zone with values of, for example, $50 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$ with two peaks around Kp 297 and Kp 255, while production decreased after Kp 318 (Fig 8). The mean PPP in the estuary was $33 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$. While the yearly global integrated primary production between the Kp 355 and 246 has been estimated at 1.32 Mg C.y^{-1} .

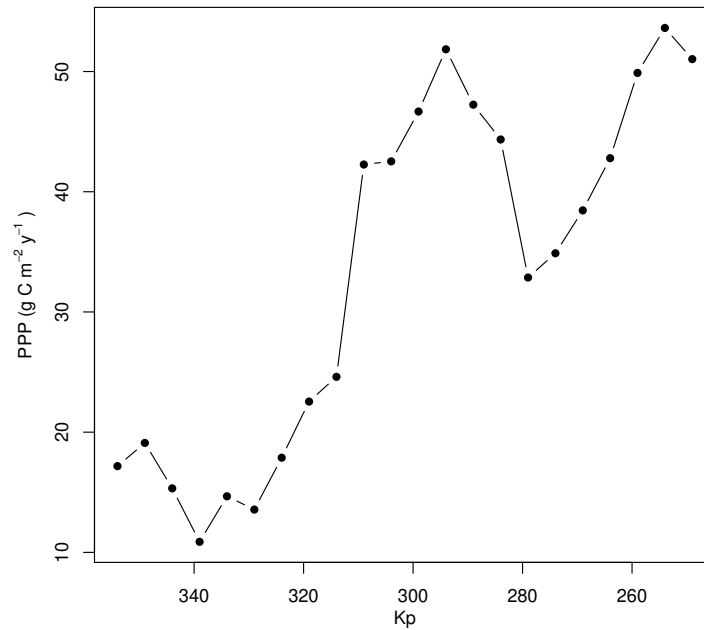


FIGURE 44 – Annual Phytoplankton Primary Production (PPP) ($\text{g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$). estimated along the Seine estuary Kp (kilometre point)

4.4 Discussion

4.4.1 Continuation of the eutrophication effect ?

Despite environmental policies and the resulting reduction in nutrients in the Seine Estuary, several values higher than $60 \mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$ were identified in this study in the summer in 2019 and in 2020 with a maximum value of $89.2 \mu\text{g chl } a.\text{l}^{-1}$ in July 2020. Such a high value has been unusual since the change in nutrient regime due to the reduction in phosphate inputs in this part of the estuary since 2000, the last report of such a value dates back to June 2001 (Némery & Garnier, 2007; Passy et al., 2016). Reducing P to limit eutrophication has been a general decision in Europe (Artioli et al., 2008; Burson et al., 2016) but Ménesguen et al. (2018a) already pointed out that reducing P was not enough to limit phytoplankton production. Based on the nutrient levels measured in the present study, a limitation pattern was identified, and, not surprisingly, excess nitrate was measured all along the transect, resulting in high dystrophic N:P and N:Si ratios. The question thus arises : does phosphate play a role as a limiting nutrient ? With a few exceptions, for example in the June 2021 transect, where in the extreme downstream part ($K_p > 318$) values dropped below $0.5 \mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$, there was no sign of complete depletion of phosphate. No clear relationships between low P concentrations due to high concentrations of phytoplankton was observed over the course of the present study, the decrease in P mainly appeared to be correlated with dilution in the downstream of the estuary. Silicate was the only nutrient displaying depletion especially during the July 2020 cruise at K_p 278. This low value matched the maximum biomass reached during a massive phytoplankton bloom. A drop in silica correlated with a diatom bloom has already been reported in the Seine estuary but that was before the change in the phosphorus policy (Garnier et al., 1995).

Diatoms in freshwater and marine systems have different stoichiometric ratios (Conley et al., 1989), for marine species, the Si:N is 2.08 ± 0.64 and Si:P is 13.78 ± 4.24 (Brzezinski, 1985) confirmed by (Sarhou et al., 2005). The stoichiometric ratio of diatoms in freshwater is Si:N is 12.64 ± 6.68 and Si:P is 83.74 ± 45.58 (Sicko-Goad et al., 1984). This difference in ratio exacerbates the need for silica in freshwater systems, whereas the level in the Seine estuary is only linked to natural rock weathering processes with no long-term variations (Romero et al., 2016). As shown by our data, N is clearly in excess (Si:N mean = 0.3 ; N:P mean = 184) while, considering the Si:P ratio (Si:P mean = 39) it is more complex to conclude on either Si or P limitation. We observed a clear Si limitation during the diatom bloom, but a small stock of P was always measured. The historical data set showed a significant relationship between a decrease in phosphate and a decrease in chl *a* in the estuary, in contrast to the lack of a clear P limitation in our data. Beside the stock of P remaining in the productive period, the dystrophy between P and N (with N:P > 300), limits phytoplankton growth. We hypothesise that nitrophilic communities are associated with low affinity for P ; the N:P balance appeared to be more important than the absolute concentration of P (Aubriot & Bonilla, 2018). As already reported in the literature, ratios between nutrients may be more informative than concentrations on limitations (Burson

et al., 2018; Guildford & Hecky, 2000).

This study thus supports the hypothesis that, without a major effort to mitigate the eutrophication effect (Tas et al., 2009) by reducing N and P, extreme events like the massive bloom (Kp 259 – 278) (Passy et al., 2016), will persist (Even et al., 2007) in critical zones.

4.4.2 Phytoplankton community structure and shift

Diatoms compose most of the species present in temperate estuaries (Rojo et al., 1994), but dominance can also vary from nanophytoplankton as Cryptophytes (Sin et al., 2013) to cyanobacteria (Paerl et al., 2020). The Seine estuary contains various community groups with dominance of groups of different size and with different pigments. The diatoms bloom in the Seine estuary are typical (Garnier et al., 1995) in summer, the pattern perfectly matched the microphytoplankton bloom on July 2020. Two months later, on September, 2021, dominance appeared to switch from microphytoplankton to nanoeukaryotes and picoeukaryotes, while no cyanobacteria appeared to account for a significant part of the phytoplankton population. The dominance of Thalassiosirophycidae in diatom blooms has already been described the Seine estuary (Sin et al., 2012), and thanks to high photoacclimation flexibility, diatoms can display optimal photosynthetic capacity in turbulent water with highly variable light (Lavaud et al., 2007) and independently of their size, can attain high carbon fixation rates (López-Sandoval et al., 2014). These elements could explain their priority in the community succession and their ability to produce high biomass. The change in the community itself is probably linked to the nutrient pattern. After the depletion of silica, which may have triggered the phytoplankton succession, there was a shift in community composition to smaller cells (picoeukaryotes and nanoeukaryotes) corresponding to chlorophytes (Garnier et al., 1995), and shifting patterns associated with changes in the nutrient ratio have already been reported (Burson et al., 2018). Despite smaller cells, this population is able to reach a level of production as high as that recorded during the diatom bloom in the same particular zone, even though chlorophytes do not have a higher photosynthetic capacity than diatoms (Dijkman & Kromkamp, 2006).

4.4.3 Drivers of primary production

The spatial pattern of primary production is quite complex. First, the upstream area between Kp 255 and Kp 274 displayed a decrease of the biomass and production, in contrast to the following area, where a rise up of production/productivity and high biomass blooms were highlighted between Kp 274 and Kp 304. This difference is quite surprising as no measured variable seems to explain why no massive bloom occurred in the upstream part (Pk <274) and why a drop of primary production is observed in this section. No environmental parameter that could influence production seems to explain this : temperature, light and turbidity are stable along the transect while nutrient levels could allow bloom trigger upward (Kp 255 - Kp 274). Many hypotheses can explain the spatial

lag in phytoplankton development as top-down control (Lionard et al., 2005) or the presence of contaminants near the metropolis of Rouen (Kp : 255) (Blanchard et al., 1999) that would limit phytoplankton development before reaching a certain point. Another hypothesis could be the effect of the tide on water residence time. At the location of the massive blooms there is a slowdown of the rising tide in spring that could increase the water residence time (Guézennec et al., 1999). Water residence time is a major driver of production and can trigger blooms (Bledsoe et al., 2004; Kristiana et al., 2012; Stumpner et al., 2020) in estuaries. Here, the production period is linked with the dry period with low flow, longer residence time, and higher light intensity on a temporal scale. This was confirmed by the decrease in oxygen and the triggering of massive blooms coupled with a decrease in silica (Raimonet et al., 2018) during the dry period. The decrease of flows reported in Seine estuary (Flipo et al., 2021) probably lead to an increase in residence times in some areas of the estuary may explain the massive blooms newly observed. In a context of climate change, the link between production, bloom triggering and the water residence time could become a major issue, the projected decrease of the river flow in the Seine estuary in the next decadal (Ducharne, 2008; Flipo et al., 2021) will potentially accentuate eutrophication with increasing massive bloom. In terms of productivity, the estuary can be divided into a highly productive part up to Kp 318 ($Kp < 318$) and a less productivity area after this station in the direction of the bay ($Kp > 318$). Nevertheless, low productivity due to high turbidity leading to light limitation can be offset by the increasing surface area after Kp 320 as the estuary expands. Moreover, even in the most productive station, the mean depth of the euphotic zone is 1.5 m, revealing the role of turbidity in reducing the eutrophication effect. Our yearly value depending on Kp ($10 - 50 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$, with a mean of $33 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$) fall within the range of values measured in the same estuary, but in a more downstream area ($64.75 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$) (Morelle et al., 2018), while the values are lower than those in most recorded eutrophic estuary systems : Scheldt estuary ($153 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$), Port hacking estuary ($237 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$), Lynher estuary ($82 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$), Peconic Bay Estuary ($177 \text{ g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$) Cloern et al. (2014). According to (Nixon, 1995) the Seine estuary as to be classified as oligotrophic despite the high nutrient levels. These results attest to a reduction in eutrophication in the Seine estuary with a few remaining extreme events in the form of massive blooms in particular places.

4.5 Conclusions

While the Seine estuary cannot be classified as an eutrophic system, this work highlights the persistence of extreme events in a few specific areas despite a reduction in the phosphate concentration in the Seine Estuary. Nutrients induces massive blooms most likely of diverse communities, as diatoms or nanophytoplankton can dominate the blooms. The dystrophy induced by the reduction of only one nutrient (P) may have changed community composition and affect succession functioning. The reason for the spatial discrepancy of the bloom appear to be complex as no single nutrient or physical pattern could explain the discrepancies. The decrease of flows and the increase in residence may explain the massive blooms newly observed. With a predicted reduction in flow of 40% by 2100, massive bloom occurrences could increase. Productivity and production were the only parameters that displayed spatial variations in the bloom area. Factors that favour or reduce photosynthetic parameters were not clearly identified in our study. Overall, apart from depletion of silicate and an N:P unbalanced ratio, which triggered community succession, the main limitation for phytoplankton primary production in the estuary is access to light due to high turbidity.

Acknowledgements

The authors thank Cédric Fisson (GIP Seine-Aval), Jean Philippe-Lemoine (GIP Seine Aval) and Olivier Cantat (University of Caen Normandie) for providing data, and Guillaume Izabel (University of Caen Normandie) for providing the map. This project was funded by the GIP Seine Aval – SARTRE programme. The project was also supported by *La Région Normandie* and *l'Agence de l'Eau Seine Normandie* which funded the PhD grant of L. Serre-Fredj. Field campaigns were supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie* and performed by *Normandie Navigation* in 2019 and 2020 and by *STO logistique* and *CSLN* in 2021. Cytosense and Labstaf were co-funded by the European Union and *La Région Normandie* (FEDER / FSE 2014–2020 Manche 2021 project).

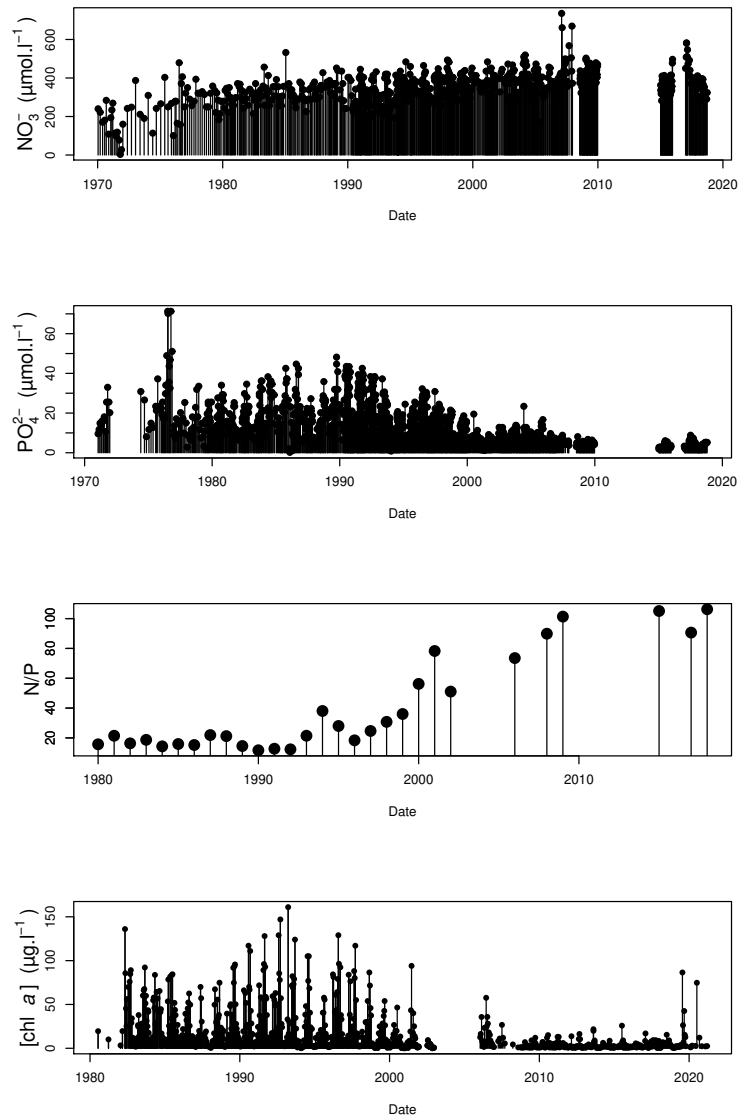


FIGURE 45 – Historical variations in the Seine estuary measured at Duclair ($K_p = 278$) : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl *a* concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).

TABLE 2 – Table reasuming campaign, For fluorimeter type : FRRF stand for FRRf-ACT2 and STAF for LabSTAF Blank cases indicate lack of data, while “X” mean presence.

Transect number	Date (DD/MM/YYYY)	Variable fluorimetry	Fluorometer type	Flow cytometry	Fluoroprobe (pigment type)	Nutrients, physical parameter, [chl <i>a</i>]
1	12/03/2019	X	FRRF			X
2	20/06/2019	X	FRRF			X
3	04/07/2019	X	FRRF		X	X
4	04/09/2019	X	FRRF		X	X
5	09/06/2020	X	FRRF		X	X
6	08/07/2020	X	LabSTAF	X		X
7	08/09/2020	X	LabSTAF	X	X	X
8	05/11/2020	X	LabSTAF	X	X	X
9	03/02/2021	X	LabSTAF	X	X	X
10	16/03/2021	X	LabSTAF	X	X	X
11	11/05/2021	X	LabSTAF	X		X
12	28/06/2021	X	LabSTAF	X	X	X
13	12/07/2021	X	LabSTAF	X	X	X

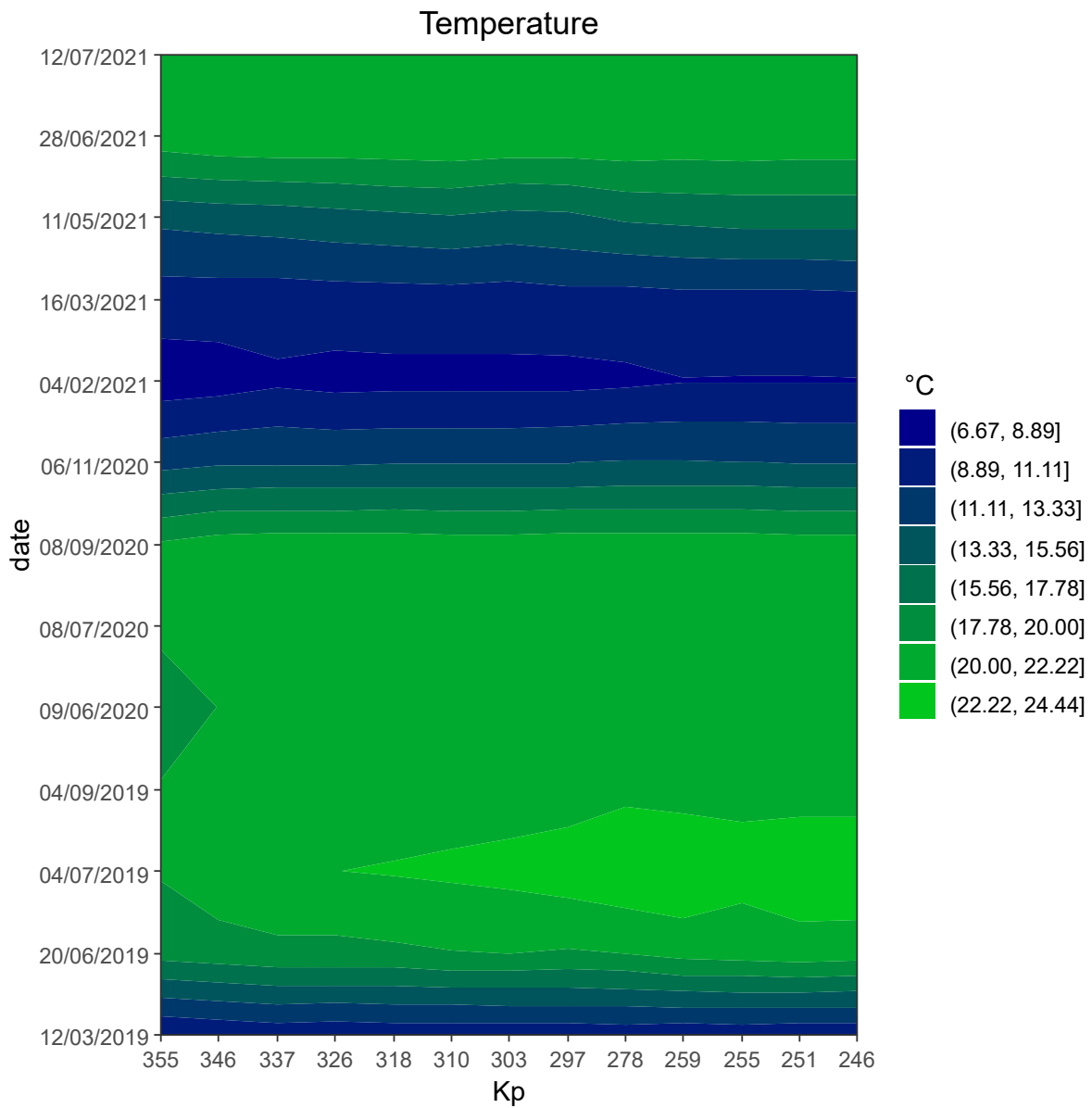


FIGURE 46 – Spatiotemporal patterns of temperature (°C) measured in the Seine estuary between March 2019 and July 2021.

Chapitre 5

Effet de la dystrophie sur les capacités photosynthétiques, la structure de communauté et la physiologie du phytoplancton

5.1 Résumé

Les expériences précédentes présentées dans ce travail ont montré l'importance de la valeur du rapport N:P sur la production primaire et la structure des communautés. Pour mieux appréhender l'effet de ce rapport, des échantillons toujours prélevés au niveau de la bouée SMILE ont été soumis à une gamme de rapport N:P cohérent avec les valeurs observées en baie de Seine ($NP = 8, 16, 30, 90, 180$ and $NP = 16 + Si$). L'effet de ces enrichissements sur les concentrations en chl *a*, en sels nutritifs, sur l'APA, sur la concentration en TEP, sur la structure des communautés (cytométrie en flux), sur les paramètres photosynthétiques (fluorimétrie variable, $\phi_{e,c}$) a été mesuré après 4 jours d'incubation. Ces incubations ont été répétées 7 fois de Juin à Septembre 2021 durant la période productive.

La croissance des communautés dépend du rapport N:P, plus il est proche de celui de Redfield (16), plus la croissance est élevée. Cette relation est confirmée par le fait que le rapport N:P consommé qui est fortement corrélé au rapport N:P. Ainsi, en conditions équilibrées (N:P proche de 16), les nutriments vont être utilisés pour former de la biomasse nouvelle (croissance) augmentant ainsi la production et l'efficacité d'utilisation de la ressource. Alors qu'en condition dystrophique, les excès vont être stockés ou utilisés dans des voies métaboliques secondaires comme l'APA ou les TEP qui augmentent en fonction de la dystrophie.

Les changements de ratio N:P se répercutent aussi sur la structure de communautés. Pour les fort rapport N:P (> 90) les nanoeucaryotes semblent favorisés contrairement aux picoeucaryotes et le microphytoplancton. De manière générale, il y a une perte de diversité fonctionnelle : au niveau des groupes cytométriques, mais aussi au niveau de l'absorption fonctionnelle avec l'augmentation du rapport N:P.

Nos résultats montrent également que les capacités photosynthétiques sont aussi affectées par la dystrophie. La production primaire ($JV_{II_{max}}$) qui dépend de la biomasse et de la productivité est meilleure à proximité du ratio de Redfield mais étonnamment, la productivité ($ETR_{II_{max}}$) augmente pour les rapport N:P élevés. Cette augmentation pourrait être dû à un mécanisme de compensation par une augmentation de l'absorption fonctionnelle (σ_{PSII}) qui va fournir de l'énergie à des voies secondaires permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire malgré la dystrophie. Nos résultats montrent également que l'augmentation d' $ETR_{II_{max}}$ ne profite pas directement à l'augmentation du carbone fixé car le $\phi_{e,c}$, c'est à dire le nombre de moles d'électrons requis pour fixer une mole de carbone augmente avec la dystrophie.

La dystrophie modifie donc la croissance, la physiologie, les capacités photosynthétiques et la structure des communautés phytoplanctoniques. Ce travail permet de caractériser l'ensemble de ces impacts et leurs interconnexions sur des communautés naturelles ce qui est rarement décrit dans la littérature.

Overall effect of dystrophy on phytoplankton communities structure, physiology and primary production.

Léon Serre-Fredj^{a,b}, Léo Chasselin^{a,c}, Orianne Jolly^{a,c}, Alexy Pecret^a, Pascal Claquin^{a,b*}

- a. Normandie Université, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
- b. Laboratoire Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, UMR CNRS 8067), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France.
- c. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine de l'Université de Caen Normandie, BP49, 54, rue du Docteur Charcot – 14530 Ifremer LER/N, Avenue du Général de Gaulle, 14520, Port-en-Bessin, France

*Corresponding Author

Pascal Claquin

Email : pascal.claquin@unicaen.fr

Address : Laboratoire Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA, UMR CNRS 8067), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, IRD 207, Université des Antilles. Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) - Station Marine, BP49, 54, rue du Docteur Charcot - 14530 Luc-sur-Mer, France

Abstract

Abstract :

Dystrophy account for the distance from the optimal stoichiometry value for phytoplankton growth which is the Redfield ratio ($N:P = 16$). In anthropized system, dystrophy is mostly cause by unbalanced input in this system affecting phytoplankton community. In this study a set of bioassay testing the enrichment of different N:P value is performed on natural community of the Seine bay in the productive period. With a wide range of parameter measured : biomass, photosynthetic parameter, community and size structure, alkaline phosphatase activity (APA), transparent exopolymeric particle (TEP) and nutrients. The result display a control of the dystrophy on the biomass with an optimal value at the Redfield ratio, the resource use efficiency allow a good prediction of the maximal PSII electron flux. In dystrophic condition, there is a physiological response to the nutrient stress with increase of APA, TEP and decrease of the maximum quantum yield of PSII. Moreover, dystrophy has a negative effect on the function diversity (pigment and size diversification) and while photosynthetic capacity as light absorption and production are reduced a mechanism of compensation based on the function cross section absorption is highlighted. Affecting negatively physiology, diversity and production dystrophy could affect system resilience.

Significance :

Due to human activity, coastal system tend to receive unbalanced nutrient input of phosphorus and nitrogen. In this study by performing incubation experiment with phytoplankton population, we show the wide range of effect dystrophy can have on this biological compartment. With an increasing dystrophy the growth of phytoplankton is reduced while its consumption depend on the balanced of supplied enrichment, the population can only have a good resource use for production when the nutrients are balanced. Dystrophy also affect negatively the photosynthesis and the functional diversity of the phytoplankton community. In order to make optimal management decision for water quality, dystrophy must be taken into account.

5.2 Introduction

The ecological theory of stoichiometry in marine system is based on the Redfield (1958) theory, which implies that there is a relatively constant equilibrium between nutrients. The equilibrium between Nitrogen (N) and Phosphorus (P) accounts for $N:P = 16$ governing phytoplankton (Falkowski, 2000). However, this exact value can be criticized as deviations from the balance can be found at multiple scales (Fraga, 2001; Geider & La Roche, 2002; Glibert & Burkholder, 2011; Ptacnik et al., 2010) with implication toward the phytoplankton feeding on these nutrients.

In the specific context of cultural eutrophication due to anthropic activity, coastal systems are supplied with unbalanced input leading to dystrophy and inducing problematic ecological consequences Malone & Newton (2020). The Bay of Seine is a typical model of coastal system where P inputs were reduced to lower the eutrophication effects (Aissa-Grouz et al., 2018) as other major rivers (Burson et al., 2016) leading to frequent co-limitation N and P (Serre-Fredj et al., 2021). Phytoplankton is the first trophic level impacted by these nutrients input in multiple ways. The stoichiometry constraint impacts the physiology (Frost et al., 2005), the resource uses efficiency (RUE) (Gülzow et al., 2018; Moreno & Martiny, 2018; Serre-Fredj et al., 2022), photosynthetic parameters (Masuda et al., 2021; Napoléon et al., 2013), the productivity (Striebel et al., 2009) ,and the community structures (Bandyopadhyay & Biswas, 2020; Leruste et al., 2019; Song et al., 2019). However, very few studies provide insights on how these parameters interact in natural phytoplankton communities.

In order to try to deepen our knowledge on the effect of dystrophy from the physiology to the community structure of phytoplankton, controlled bioassays experiments using coastal natural phytoplankton communities were performed as a function of a N:P gradient inputs. By coupling a wide range of approaches on diversity, physiology, photosynthesis, new insights on these issues are explored.

5.3 Material and Methods

In order to assess the impact of dystrophic input, natural communities of phytoplankton sampled during the productive period (June to September 2021) in the Bay of Seine (0°19'41.00"N 49°21'14.00"E) were supplied with different input of nutrient. Six conditions were defined using the range measured in the Bay of Seine : NP = 8, 16, 30, 90, 180 and NP = 16 + Si (concentration can be found in SI appendix). For each condition five replicates were performed. At the time of sampling and after 4 days of incubation in a natural fuelled water bath with natural light different measurement were performed : nutrient, chl *a*, phosphatase alkaline activity (APA), transparent exopolymeric particle (TEP), carbon fixation rate using ¹³C incubation, photosynthetic and pigment parameter and phytoplankton structures. The whole incubation experiment was repeated 7 times over the productive period.

For TEP_{chl*a*} concentration, sample were filtrated and stained with Alcian Blue. After 2 h of exposition of H₂SO₄ measures were performed with a Pharmacia Biotech Ultrospec 1000 Spectrophotometer at 787 nm. MUF-P (4-Methylumbelliferyl phosphatase) substrate was added to water sample to measure APA concentration. Hourly measurements were performed during 5 h using a RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Japan). APA was calculated as the slope of the linear regression. To normalize by biomass, values of TEP and APA were divided by the concentration of chl *a*.

The structure of population of phytoplankton, samples were analysed with cytometry (CytoSense, cytobuoy Netherland). Size normalized beads (Fluoresbrite® YG microsphere, Polyscience) were used to cluster the phytoplankton community between three groups size (0-2, 2-20, >20 µm).

Photosynthetic parameter were measured using a Labstaf (Chelsea technologies Ltd) using the single turnover method, relative transport rate (rETR_{max}) was estimated with Boatman et al. (2019) model. Production (JV_{I_{max}}) was calculated using Oxborough et al. (2012) algorithm and adapted by Boatman et al. (2019). To quantify the change in functional absorption depending on the wavelength the cross-section functional absorption at 452 nm (σ_{452}) was divided by the integration of this parameter (σ_{PSII}) along the light spectrum (416-622 nm).

The carbon fixation rate (P_c) in µg C .h⁻¹.m⁻³ was estimated trough ¹³C incubation (Napoléon & Claquin, 2012). After being enriched, water sampled chosen from few incubation (n = 54) were exposed to a light corresponding to the E_k measured just earlier with the Labstaf for 2h.

The electron requirement for carbon fixation $\Phi_{e,c}$ is calculated as :

$$\Phi_{e,c} = JV_{II}(Ek)/P_c(Ek) \quad (23)$$

The RUE_{NP} is calculated as : $RUE_{NP} = [\text{chl } a] / \min\{N/16; P\}$ with NO_3^- as N and PO_4^{3-} as P following (Serre-Fredj et al., 2022).

In order to fit Isles (2020) recommendations the log functions has been applied to all N:P ratio in figure in order to better display the distance from the equilibrium to high and low ratio.

Additional materials and methods are provided in SI Appendix.

5.4 Result and discussion

5.4.1 Consumption and production in dystrophic condition.

The Redfield ratio is highlighted by this experiment for the natural community in the productive period as the optimum for growth with a mean of 16 $\mu\text{g. chl } a^{-1}$ for the N:P = 16 enrichment which account for the maximum (with the exception of the N:P = 16 + Si) (Fig 47.A). The addition of Si increased the growth as the diatoms community limitation was lifted, but the Si has already been highlighted as being secondary in comparison to N and P in this system (Serre-Fredj et al., 2022). This statement was already assess in this N & P co-limited area in Serre-Fredj et al. (2022) and in other study (Glibert et al., 2012; Zhang et al., 2020a). Therefore when exposed to increasing dystrophic enrichment the biomass produced decrease accordingly (Striebel et al., 2009). The log-log relation between the initial N :P ratio and the consumed one ($\log(N:P_{\text{consummed}}) = 0.6 \log(N:P_{\text{initial}}) + 1$, $R^2 = 0.90$) indicates a clear modification of the absorption of nutrient under unbalance condition (Fig 47.B), illustrating a process well described in (Moreno & Martiny, 2018). A smooth transition is displayed between a phase of low growth rate where the absorption match the dystrophic supply (the “you are what you eat”) (Frost et al., 2005) corresponding to poor biomass production at unbalanced N:P ratio, while near balance high growth rate is displayed while consumed nutrient converges toward the optimal ratio (the “you eat what you need” phase). At highly unbalanced input, these dystrophic consumptions could end with unbalanced cells quota due to luxury uptake and storage (Hall et al., 2005). This statement is supported by the link between resource use efficiency (RUE_{NP}) and maximum primary production rate ($JV_{II\text{max}}$) ($JV_{II\text{max}} = 1.1 RUE_{NP} + 62$, $R^2 = 0.70$, $p_{\text{value}} < 10^{-16}$) at the end of the incubation (Fig 47.C), the limitation of nutrient decrease the RUE as the excess one cannot be assimilated (Gülzow et al., 2018). A well-constrained RUE with knowledge of environment (see supplementary Fig.51) could be used as a proxy of maximal primary production. Finally, phytoplankton community supplied with balanced enrichment can assimilate nutrient leading to a higher RUE and a higher biomass as asses by the primary production result (Fig 47. C). In dystrophic conditions (here N:P » 16) the resource use efficiency is lower due to the lack of P while the excess of N is stored modifying the physiological status of the cell (Gülzow et al., 2018).

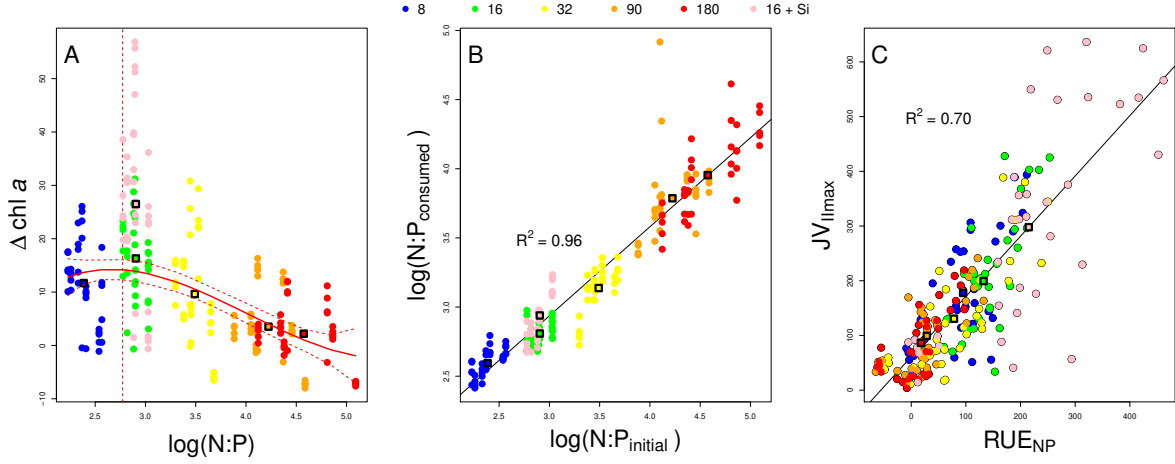


FIGURE 47 – Production and consumption : relationship between chl *a* production and the log N:P value (A). The horizontal solid red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line. Relationship between the log $N:P_{consumed}$ ratio and the log $N:P_{initial}$ (B). Relationship between RUE_{NP} and the production (JV_{lmax}) (C). Red vertical line indicates the redfield ratio ($N:P = 16$), square coloured point display barycentre of each enrichment group.

5.4.2 Limitation and physiological responses.

When supplied to a gradient from balanced to unbalanced nutrient phytoplankton community reacts and adapts. In order to offset the lack of inorganic phosphorus they can produce phosphatase alkaline for an energetic cost to convert organic phosphorus in inorganic phosphorus (Lin et al., 2016). Therefore phosphatase alkaline activity (APA) can be used as an indicator of phosphorus limitation. Unsurprisingly when increasing the N:P ratio supply the APA produced increase as well (Fig 48.A) showing that limited community will adapt to supply their needs by other pathways. TEP can also be used as an indicator of limitation and display the same pattern as APA, i.e; when distance from the equilibrium the TEP production increase (Fig 48.B). The increase of TEP production can reveal N or P limitation (Corzo et al., 2000; Engel et al., 2015; Mari et al., 2005) and of skewed N:P (Pandey & Pandey, 2015). However, more than an indicator, TEPs production is an important pathway of carbon overflow under carbon overconsumption (Mari et al., 2001) which helps us distinguish consumption (i.e. uptake) from assimilation. This change in production of TEPs could also have secondary effect on the phytoplankton as TEPs play a role of protection against virus and some grazers (Dutz et al., 2005; Nissimov et al., 2018). The maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) can attest numerous stress of the phytoplankton community such as nutrient limitation (Parkhill et al., 2001) and display the physiological status of the community (Serre-Fredj et al., 2021). Even with a high variability and a wide range (0.15 - 0.52) of values displayed, the F_v/F_m slightly decreases at high N:P (the mean value for N:P = 90 and 180 account for 0.35, while the N:P = 8, 16, 32 account for 0.39) showing a stress response under dystrophic conditions (Fig 48.C). The three physiological indicators used in this study conclude that divergence

from the N:P optimum change the metabolism and stress response of the phytoplankton community even of communities from dystrophic coastal waters. At high N:P ratio the phytoplankton produces more energetically costly APA and exude an excess of carbon, as TEPs, not usable for growth.

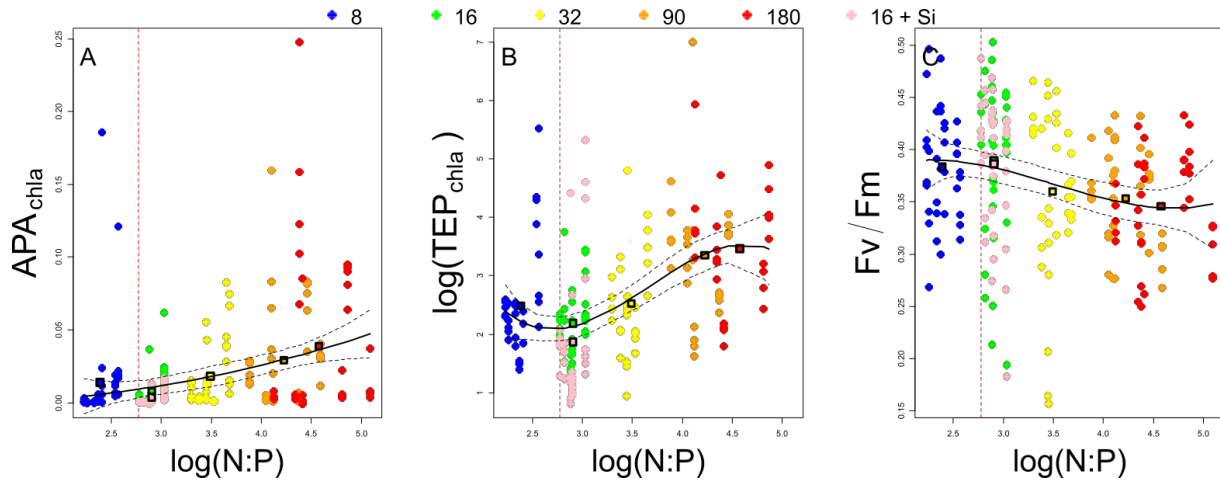


FIGURE 48 – Physiological response to dystrophy : relationship between APA_{chl}a and the log N:P value, (A). Relationship between the log TEP concentration and the log N:P value (B). Relationship between Fv/Fm and the log N:P value (C). Red vertical line indicate the redfield ratio (N:P = 16), the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.

5.4.3 Functional diversity change

The size structure of phytoplankton community has been modified with the gradient of N:P ratio. The proportion of picophytoplankton (0 - 2 μ m) seems to attain a maximum near a N:P = 30, and decrease while distancing from this value (Fig 49.A). The nanophytoplankton (2 - 20 μ m) display opposite variation from the picophytoplankton with a minimum near N:P = 33 while the proportion increase in the most dystrophic condition N:P < 16 and N:P > 90 (Fig 49.B). Finally, the microphytoplankton proportion seem to decrease while distancing from the Redfield ratio with a stronger decrease after the N:P > 90 (Fig 49.C). Even with a high variability due to different sampled community an overall pattern can be assess on the size structure : in dystrophic conditions, the nanophytoplankton group is taking over while both pico and micro are decreasing, this decrease of diversity of size structured has already been highlighted (Alejandra Paredes & Montecino, 2011). This specialization of the phytoplankton community is also displayed by other functional indicator : the decrease at high N:P of the Pielou index based on more distinguish cytometric groups indicates that particular groups are more likely to dominate which can be associated with a loss of functional diversity (Supplementary Fig.52). The same conclusion can be drawn from the increase of the proportion of the functional cross absorption ($\sigma_{452}/\sigma_{\text{integrated}}$) which indicates a modification in pigment absorption of the

phytoplankton community at high N:P (Supplementary Fig.52). The functional absorption spectrum of the phytoplankton community of widen near the Redfield N:P ratio which indicates a reduction of light harvesting capacities in dystrophic condition, the spectral palette of the absorbed light is less important. Our results showed how the stoichiometry of phytoplankton affects functional diversity (Carnicer et al., 2015), in terms of size community structure, cytometric groups and light harvesting modification.

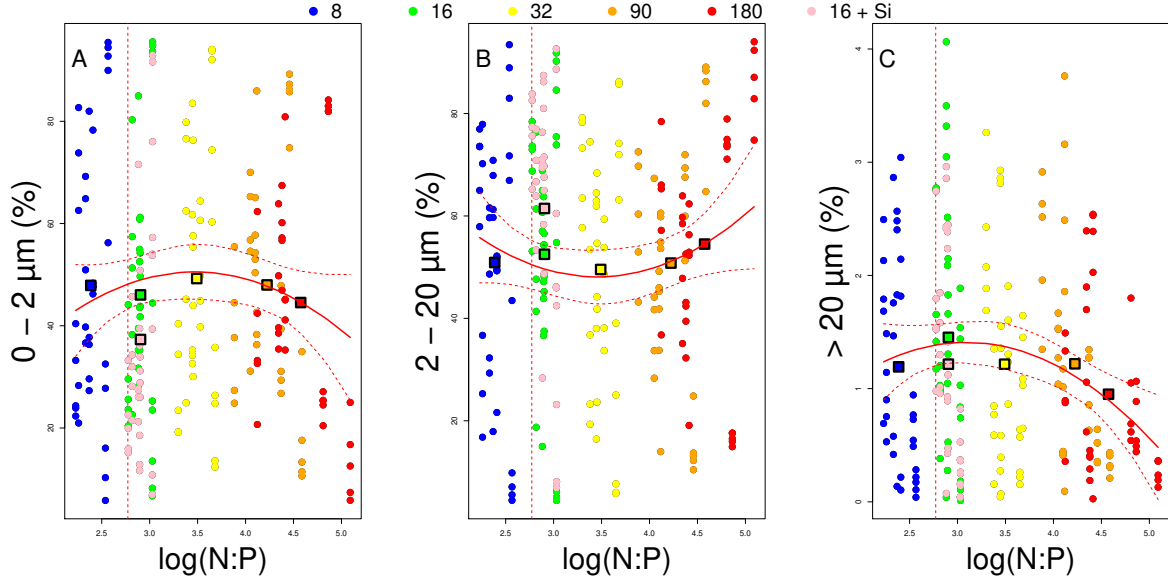


FIGURE 49 – Dystrophy effect on size structure : relationship between picophytoplankton (0-2 µm cells) and the and the log N:P value (A). Relationship between nanophytoplankton (2-20 µm cells) and the and the log N:P value (B). Relationship between microphytoplankton (>2 µm cells) and the log N:P value (C). the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line.

5.4.4 Effect of community change and dystrophy on photosynthesis

The maximal production ($JV_{II_{max}}$) of the phytoplankton community follow the same variation as the biomass, with a decrease of production when distancing from the optimal ratio (Fig 50.A). The decrease of one of the most productive compartment : the microphytoplankton could exacerbate the loss in production capacity (Uitz et al., 2010). The dynamic of maximal productivity ($ETR_{II_{max}}$) may appear more surprising as it increases steadily in limited condition (Fig 50.B). However, the majority of photosynthetic parameters seems to decrease or indicates a stress at high N:P (Supplementary Fig.54). An hypothesis would be either an adaptation of a selected population due to change in functional diversity (Striebel et al., 2009) or a metabolism plasticity of the bulk community under nutrient stress. As seen in the part 3.3 in dystrophic condition nanophytoplankton are favoured, pigments are more specialized. Which means that their difference in

functional diversity plus there is also a physiology change as limited cells seem to compensate the lack of nutrient by increasing the functional absorption cross-section of PSII (Supplementary Fig.53). Nevertheless, the $\Phi_{e,c}$ variation must be accounted when interpreting the apparent increase of the productivity as the $\Phi_{e,c}$ increase with the N:P the cost of production of a mole of carbon in electron increase too offsetting the $ETR_{II\max}$ raise. The slight decrease observed for the last condition (N:P = 180) could result from an underestimation of the variability of the parameter (Fig 50.C). Still value of $\Phi_{e,c}$ of N:P > 30 are higher than the rest. This increase could be linked to nutrient limitation (Hughes et al., 2018; Ko et al., 2019; Lawrenz et al., 2013; Napoléon & Claquin, 2012; Napoléon et al., 2013). The increase of activity of secondary pathway like APA, AMA and TEP could need the derivation of electron to supplied alternate routes (Grossman et al., 2010; Napoléon et al., 2013; Rychtecký et al., 2015). Another hypothesis is the change in community, the community structure impact the $\Phi_{e,c}$ (Hughes et al., 2021) and in our experiment the increase of $\Phi_{e,c}$ is concomitant with the decrease of microphytoplankton (Zhu et al., 2017). Overall, we provide clues on the effect of change of metabolism and functional diversity on the production and productivity at the community level of phytoplankton. These finding fit the BEF (Biodiversity-Ecosystem Function) theory where a loss of diversity affect negatively the function of the ecosystem.

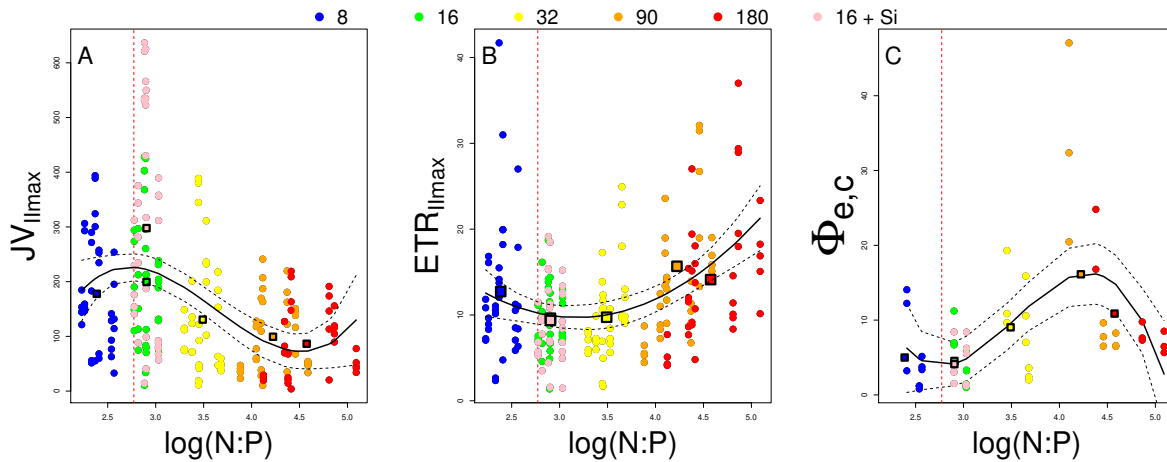


FIGURE 50 – Dystrophy effect on photosynthesis : relationship between production ($JV_{II\max}$) and the and the log N:P value (A). Relationship between productivity ($ETR_{II\max}$) and the and the log N:P value (B). Relationship between the carbon fixation requirement ($\Phi_{e,c}$) and the log N:P value (C). Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line.

5.5 Conclusion

Dystrophy caused by unbalanced N:P ratio impacts deeply the phytoplankton community at multiple levels. As the uptake of nutrient depends on the balance, in dystrophic

condition phytoplankton community are limited and multiple another pathway. The increase of TEP, APA, and σ_{PSII} under dystrophic indicate a physiological reaction to acclimate. At high N:P the RUE, growth, production, photosynthetic capacity and biodiversity are all negatively affected depending on the distance from the optimal N:P ratio which is the Redfield one. The decrease of the phytoplankton community function and diversity modification will affect higher trophic level and more generally the carbon flux in costal ecosystems.

Acknowledgements

We thank David Lemeille, Maxime Navon, Michel Repecaud and the CREC station for technical support. This work was funded by the SMILE² and *RIN ECUME* projects respectively supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie*, the European Regional Development Fund of Normandie, and *La Région Normandie* and by the PLEASE PhD project supported by *l'Agence de l'Eau Seine Normandie* and *La Région Normandie*. The *Cytosense* and *Labstaf* were co-funded by the European Union and *La Région Normandie* (FEDER/FSE 2014-2020 Manche 2021 project). The platform PLATIN from US EME-RODE of University of Caen Normandie for isotopes analysis.

5.6 Supplementary information

5.6.1 Extended material & method.

Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$)

Bioassay design was modified from (Ly et al., 2014) to fit our specific requirements (Serre-Fredj et al., 2022). Seawater was sampled at the SMILE buoy site. To remove large grazers, the seawater was filtered through a 100- μm mesh immediately after sampling. For the bioassays, enrichments were added to 500-ml sub-samples in polycarbonate bottles one hour after sampling and placed in an incubator. All bioassays were incubated in a water bath incubator for 4 days under natural sunlight in a greenhouse. The water bath incubator was fuelled continuously with seawater pumped directly from the sea maintaining the incubator to the temperature of the Bay. Seawater temperature and PAR were recorded at 5-min intervals using respectively, a RBRsolo T logger and a RBR solo³ PAR logger connected to a Li-COR LI-192 Underwater Quantum Sensor. Six types of enrichment treatments based on the N:P, each with five replicates, were performed in the incubator : N:P = 8, 16, 32, 90, 180 and 16+Si, exact concentrations are resumed in supplementary table 1. The maximum enrichments applied in the bioassays were defined by the maximum value of N (50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), P (3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) and Si (50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) measured in the year 2018 in the Bay of Seine by SOMLIT (SNO IR ILICO - Coastal Observation Service, CREC Marine station, Luc-sur-Mer).

After 4 days, 25 ml were sampled in all bioassay bottles and homogenized before measuring photosynthetic, flow-cytometer and alkaline phosphatase activity (APA). TEP, nutrient and Chl *a* concentration were the performed.

TABLE 3: Enrichment concentration table. Concentration value are displayed in $\mu\text{mol.l}^{-1}$

N:P	NO_3^-	PO_4^{3-}	$\text{Si}(\text{OH})_4$
8	25	3	0
16	50	3	0
32	50	1.7	0
90	50	0.75	0
180	50	0.37	0
16 + Si	50	3	50

Measurements of inorganic nutrients (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$)

Water samples were collected and filtered through a ClearLine, CA, 33 mm, 0.45 μm cellulose acetate filter and immediately frozen (-20 °C), with the exception of $\text{Si}(\text{OH})_4$ which was stored at 4 °C. Analyses were conducted using a SEAL Analytical AA3 system (Aminot & Kérouel, 2007). The quantification limits were 0.02 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for PO_4^{3-} and 0.05 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ for NO_3^- , NO_2^- , $\text{Si}(\text{OH})_4$. The N/P ratio was calculated as $\text{NO}_3^- / \text{PO}_4^{3-}$. The N/P_{consumed} was calculated as $(\text{N}_{\text{start}} - \text{N}_{\text{end}}) / (\text{P}_{\text{start}} - \text{P}_{\text{end}})$ where N_{start} and P_{start} represent the concentrations of N and P at the beginning of the incubation (i.e. the stock of nutrient

in the sampled water plus specific enrichment) and N_{end} and P_{end} the concentrations of N and P at the end of the incubation.

Chlorophyll-a measurements

Water samples (250 ml) were filtered through a Whatman, GF/F 47 mm, 0.7 μm glass-fiber filter and immediately frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until analysis. Ten ml of 90 % acetone (v/v) were added to extract the pigment and the samples were then left in the dark at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 h. After being centrifuged for 5 min at 1,700 g twice, the concentration of chl *a* in the extracts was measured using a Trilogy fluorometer (Turner Designs, Sunnyvale, USA) according to the method of Strickland & Parsons (1972). The $\Delta\text{chl } a$ is calculated as $\text{chl } a_{\text{end}} - \text{chl } a_{\text{start}}$.

Transparent exopolymeric particles (TEP)

Water samples (150-200 ml) were filtered through Millipore, 0.4 μm polycarbonate membrane filters and immediately frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until analysis. Following Claquin et al. (2008) adapted from Passow & Alldredge (1996), the filters were stained with a solution 0.02% Alcian Blue solution (Sigma) with 0.06 % acetic acid (pH : 2.5). Excess dye was removed by adding water before centrifugation at 3,000 g, at $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. This washing cycle was repeated twice, after which 6 ml of 80 % H_2SO_4 were added. After 2 h, measurements were taken using *Pharmacia Biotech Ultrospec 1000 Spectrophotometer* at 787 nm. Calibration was done using xanthan gum (10-700 μg) as standard, as described in Claquin et al., (2008). After being divided by the chl *a* concentration, TEP concentrations are expressed in $\mu\text{g Xanthan eq.}\mu\text{g chl } a^{-1}$.

Alkaline phosphatase activity (APA)

Potential maximum APA per chlorophyll unit was measured according to Hrustic et al. (2017). Samples (3,920 μl) were placed in a UV cuvette and 80 μl of 4-Methylumbelliferyl phosphatase (MUF-P) 500 μM substrate were added. While incubating at room temperature, the samples were measured at hourly intervals over a total period of 7 h. Measurements were made with a RF-6000 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Japan). APA was calculated as the slope of the linear regression. Using a MUF standard curve, the results are expressed in concentration units per hour divided by the concentration in Chl *a* to normalize by the biomass, thus obtaining $\text{APA}_{\text{chl } a}$ ($\text{nM.h}^{-1}.\mu\text{g chl } a^{-1}.\text{l}^{-1}$).

Fluorometry to assess photosynthetic parameters

FLCs (fluorescent light curve) were measured *in situ* by the buoy using a LabSTAF. The samples were analysed after a 5 min period of dark incubation for the oxidation of the Quinone A (Q_A). At the end of the dark period F_0 (minimum fluorescence) was measured by using non-actinic weak light. A single-turnover (ST) protocol consisting of a solid 100- μs flash (450 nm) was applied for measuring F_m (maximum fluorescence in dark). The maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) was calculated as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} \quad (24)$$

Samples were then exposed to 10 light steps of increasing PAR (from 0 to 1,500 μmol

photon.s⁻¹.m⁻²) for 30-sec each step. The effective quantum efficiency of PSII ($F_{q'}/F_{m'}$) was measured at each light step as (Genty et al., 1989) :

$$\frac{F_{q'}}{F_{m'}} = \frac{(F_{m'} - F')}{F_{m'}} \quad (25)$$

Where $F_{m'}$ is the maximum fluorescence under light and F' the steady state fluorescence under light.

The relative electron transport rate (rETR, relative unit) was calculated for each irradiance (E) as :

$$rETR(E) = \frac{F_{q'}}{F_{m'}} \cdot E \quad (26)$$

The maximum relative electron transport rate ($rETR_{max}$) was estimated by fitting the FLC data to the model of Webb et al. (1974) modified by Boatman et al. (2019) using RunSTAF (Chelsea Technologies, UK) software to estimate α and E_k with α , the initial slope of the FLC, and E_k the light saturation index :

$$rETR(E) = \alpha \cdot E_k \cdot (1 - e^{\frac{-E}{E_k}}) - \beta \cdot E_{k\beta} \cdot (1 - e^{\frac{-(E-E_k)}{E_k\beta}}) \quad (27)$$

$rETR_{max}$ is calculated as :

$$rETR_{max} = \alpha \cdot E_K \quad (28)$$

Using the absorption algorithm of Oxborough et al. (2012), the PSII electrons flux per unit volume is calculated as follows :

$$a_{LHII} = \frac{F_m \cdot F_0}{F_m - F_0} \cdot K_a \cdot 10^{-6} \quad (29)$$

where K_a is an instrument inherent constant (here $K_a = 11800$). Finally, the PSII flux per unit volume ($JV_{II_{max}}$) is calculated as :

$$JV_{II_{max}} = \frac{a_{LHII} \cdot rETR_{max} \cdot 3600}{10^3} \quad (30)$$

Where $JV_{II_{max}}$ is expressed in mmol e⁻.m⁻³.h⁻¹

The electron transport rate ($ETR_{II_{max}}$) is calculated as :

$$ETR_{II_{max}} = \frac{JV_{II_{max}}}{[chl a]} \quad (31)$$

where $ETR_{II_{max}}$ is expressed in mmol e⁻.mg chl a⁻¹.h⁻¹

The electron requirement for carbon fixation ($\Phi_{e,c}$) which determine the number of mol of e⁻ produced required to fix a mol of C is calculated as :

$$\phi_{e,c} = \frac{ETR_{II_{max}}}{P_c} \quad (32)$$

Then a functional pigment diversity indicator is assessed based the cross-section functional absorption σ (e.g. the slope value of the fluorescence when the single turnover flash increase from F_o to F_m). The cross-section functional absorption at 452 nm (σ_{452}) is divided by the integrated value of sigma at seven wavelength (416 nm, 452 nm, 473 nm, 495 nm, 534 nm, 594 nm, 622 nm) as :

$$\sigma_{452}/\sigma_{PSII} = \sigma_{452}/\int_{416}^{622} \sigma_{\lambda} d\lambda \quad (33)$$

Non-photochemical quenching is calculated as :

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m} \quad (34)$$

Flow cytometry

Unfixed sample were analysed within one hour of sampling with the CytoSense (Cytobuoy b.v., Netherland) equipped with a blue laser (488 nm, 50 mW) and a green laser (552 nm, 50 mW). This produces pulse shapes based on the inherent optical properties of the particle when they cross the laser : sideward angle scatter (SWS), forward scatter (FWS), red (FLR, 668-734 nm), orange (FLO, 601-668 nm) and yellow fluorescence (FLY, 536-601 nm). The threshold was set at 16 mV to reduce data acquisition concerning non-photosynthetic particles triggered on FLR, for each sample (5 per enrichment) 380 μ l were analysed with a speed of 2.0 μ l.s⁻¹. The CytoSense can analyse chains, cells, or colonies between 1 and 800 μ m in diameter, microspheres of 1 μ m (Yellow-Green fluorescent, FluoSpheres®), 1.6 μ m (non-fluorescent, provided by Cytobuoy) and 2 μ m, 6 μ m, 10 μ m, 20 μ m (Fluoresbrite® YG microsphere, Polyscience) were used to calibrate size recording (daily use). To distinguish the phytoplankton, five clusters were determined using the cells optical properties and attributed to *Synechococcus* spp., picoeukaryotes, nanoeukaryotes and microphytoplankton and Cryptophytes. The *Synechococcus* spp. cluster has the smallest FWS signal and a high orange fluorescence (FLO) signal which matches very small cells with a high concentration of phycoerythrin.

First size groups were assessed based on the cells size (< 2 μ m ; 2 - 20 μ m ; > 20 μ m). Then usual cytometric groups were defined to compute à structure diversity indicator. Picoeukarotic cells are small cells (< 2 μ m) and produce low FLR and FWS signals. Nanoeukaryotics (2 - 20 μ m) and microphytoplankton (> 20 μ m) cells were differentiated from picoeukaryotic cells using the amplitude of the FLR signal and the bead signal. Cryptophyte clusters have higher FLO than *Synechococcus* due to the high concentrations of phycoerythrin in their cells and an FWS equivalent to the nanoeukaryotic and microphytoplankton cells (Olson et al., 1989; Thyssen et al., 2014).

To asses structure diversity indicator Shannon-Wiener (H') and Pielou (J') index were computed using cytometrics groups (Li, 1997) :

$$H' = -\sum p_i \log(p_i) \quad (35)$$

$$J' = H' / \log(S) \quad (36)$$

Where p_i is the proportion of the cytometric group i and S is the number of cytometric groups.

RUE calculation

Based on the equation of Ptacnik et al. (2008) a single nutrient constraint RUE equation were defined as :

$$RUE_N = \frac{\text{chl } a_{\text{end}}}{N} \quad (37)$$

$$RUE_P = \frac{\text{chl } a_{\text{end}}}{P} \quad (38)$$

$$RUE_{\text{Si}} = \frac{\text{chl } a_{\text{end}}}{\text{Si}} \quad (39)$$

Based on Serre-Fredj et al. (2022) we defined the nutrient ration constraint RUE_{NP} as :

$$RUE_{\text{NP}} = \frac{\text{chl } a_{\text{end}}}{\min\left\{\frac{N}{N/P_{\text{balanced ratio}}}, P\right\}} \quad (40)$$

Where $\text{chl } a_{\text{end}}$ is the concentration at the end of the incubation, N , P , Si concentrations correspond to values of N_{start} , P_{start} and Si_{start} of respectively NO_3^- , PO_4^{3-} and $\text{Si}(\text{OH})_4$ at the begin of each incubation (i.e. the stock of nutrient in the sampled water plus specific enrichment). Here the $N:P_{\text{balanced ratio}}$ accounts for the 16/1 Redfield ratio (Redfield, 1958) (Equation 2). The minimum function (min) makes it possible to account for the last limiting nutrient in the alternating nutrient limitation system.

5.6.2 Extended Result & discussion.

Link between RUE and Production.

The resource uses efficiency can be constraint by multiple parameters, depending on the system or of the studied nutrient (Hodapp et al., 2019). When compared to the indicator of maximal production (JV_{IImax}) (Figure 51) RUE displays a good correlation. The RUE_{Si} displays the worst correlation ($R^2 = 0.10$, $p_{\text{value}} = 0.07$) (Figure 51, A), this result is not surprising as the Si seems to have only a secondary role in the nutrient regimen in this area (Serre-Fredj et al., 2022, 2021). RUE_P displays a slightly better correlation ($R^2 = 0.16$, $p_{\text{value}} = 2.0 \cdot 10^{-9}$) (Figure 51, B). RUE_N (Fig, 51 C) displays a better correlation than the two other ($R^2 = 0.49$, $p_{\text{value}} < 10^{-16}$). The difference of the correlations between RUE_P and RUE_N can be explained by the presence of outlier points at high and low RUE_P . Eventually, the RUE_{NP} displays the better correlation with the JV_{IImax} ($R^2 = 0.68$, $p_{\text{value}} < 10^{-16}$). Overall, with a simple indicator as the RUE associated with the right factors (i.e N and P in the present study), we can obtain an accurate proxy for the primary

production, while highlighting the need to well constrained the calculation according to the knowledge of the system.

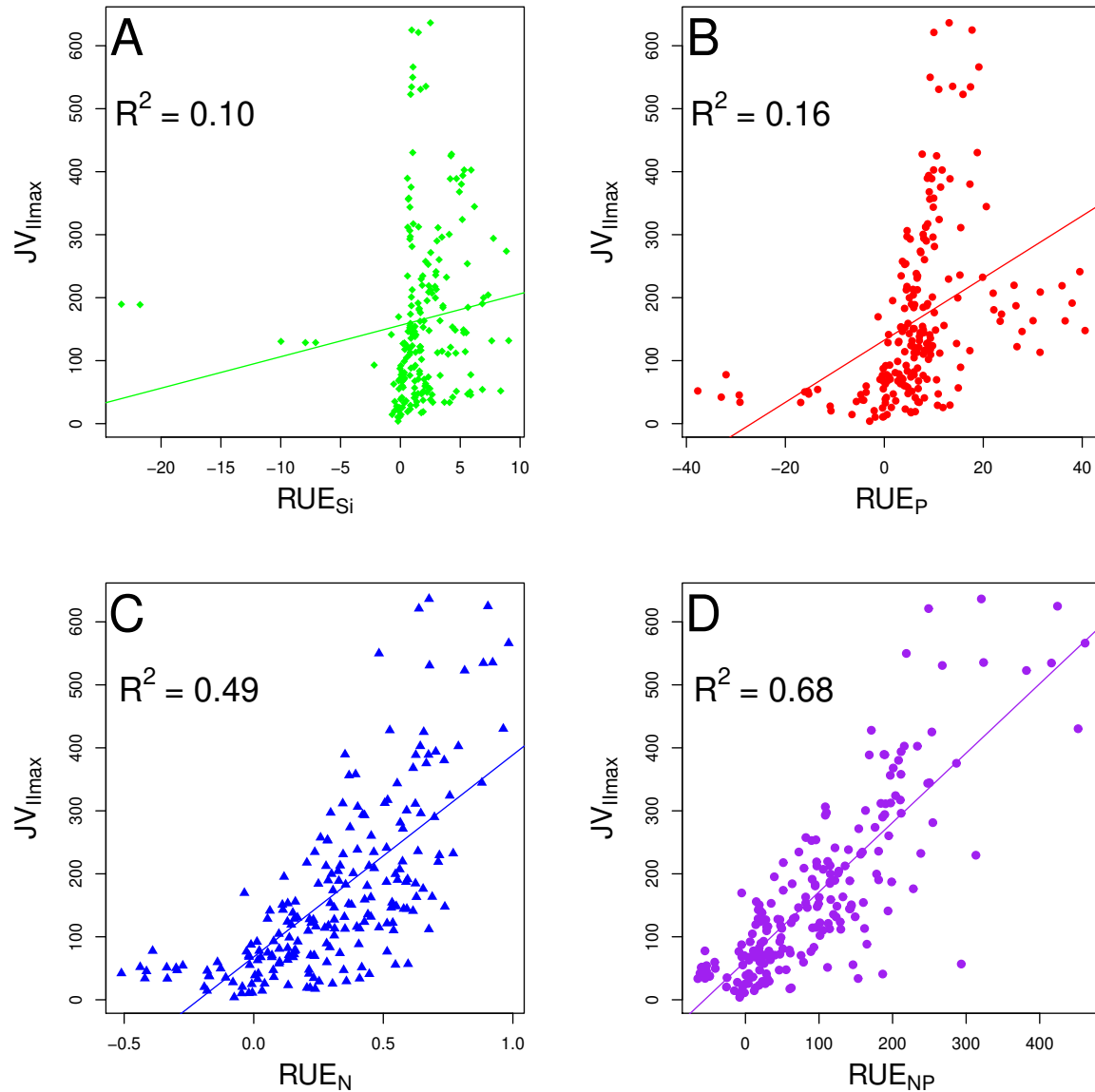


FIGURE 51 – RUE constraints : relationship between RUE_{Si} and the production (JV_{IImax}) (A). Relationship between RUE_P and the production (JV_{IImax}) (B). Relationship between RUE_N and the production (JV_{IImax}) (C). Relationship between RUE_{NP} and the production (JV_{IImax}) (D). Solid coloured line display linear regression.

Diversity indicator

Two types of diversity indicators were calculated. The first one is the evenness based of cytometric groups combining cell size information and fluorescence. Even with a variability depending on the initial population, the regression indicates a slight decrease of evenness at high N:P ratio ($N:P > 90$) (Figure 52. A), at low N:P ratio the dystrophy does not seem to be enough to see modification. The second one is the specialisation of the functional

absorption ($\sigma_{452}/\sigma_{\text{int}}$), the value of the parameter rises also at high N:P ratio ($\text{N}:\text{P} > 90$) while being stable otherwise (Figure 52. A). This rise means that the capacity of light absorption at a wavelength different than 452 is reduced in dystrophic conditions, narrowing the diversity of niche along the spectral gradient (Behl et al., 2011). The same conclusion can be drawn from these two indicators : in dystrophic conditions, there is a decrease of the functional diversity.

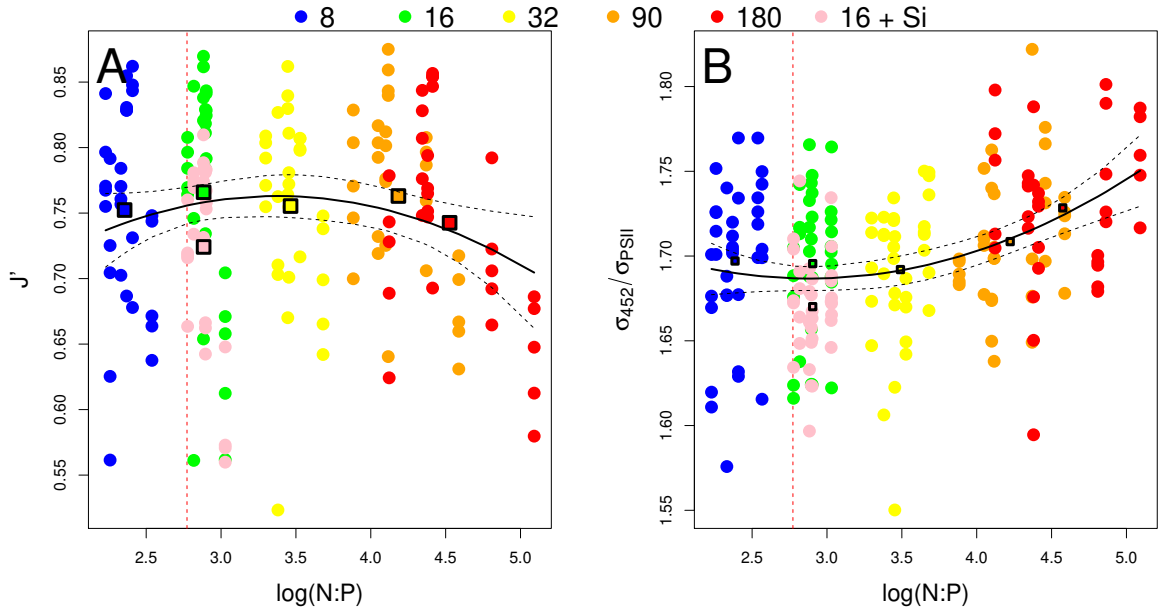


FIGURE 52 – Functionnal diversity : relationship between Pielou index based on cytometric groups and the log N:P value (A). Relationship between $\sigma_{452}/\sigma_{\text{PSII}}$ and the log N:P value (B). Red vertical line indicates the Redfield ratio ($\text{N:P} = 16$), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.

Light harvesting capacity

Dystrophic conditions affect the capacity phytoplankton community to interact with light. The non-photochemical quenching (NPQ) is an indicator of the part of excessive light dispersed as heat. This parameter increases when the N:P digresses from the Redfield ratio (Figure S3, A). The light saturation parameter (E_k) indicates the optimal value of light for photosynthesis of the phytoplankton community. This parameter decreases at high N:P ratio (N :P > 30) (Supplementary Fig. 54, B).

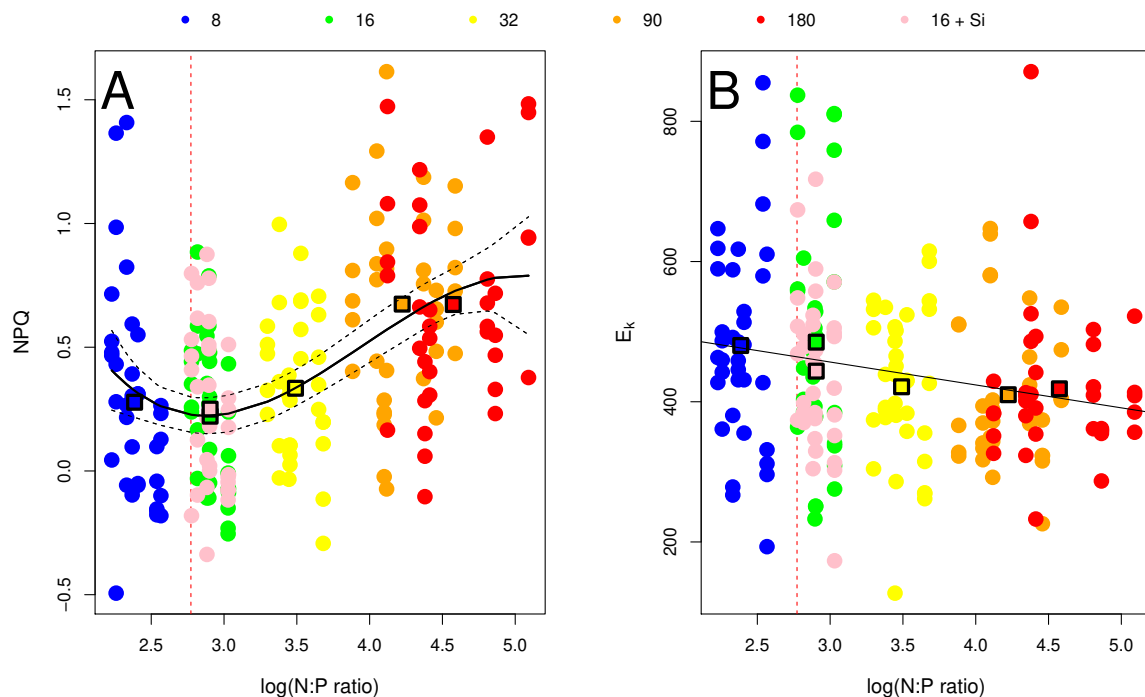


FIGURE 53 – Light and dystrophy : Relationship between NPQ and the log N:P value (A). Relationship between E_k and the log N:P value (B). Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line.

Compensation

The cross-section function absorption (σ) values exhibit a net increase when the N:P ratio differ from the Redfield ratio (N:P = 16) (Supplementary Fig. 54). In this experiment, most of the photosynthetic parameters show a decrease under dystrophic conditions. In spite of this, the maximal productivity ($ETR_{I\max}$) is increasing. This increase could be linked to a process of offsetting to compensate the energy loose in alternative electron pathways due to nutrient limitations (Napoléon et al., 2013).

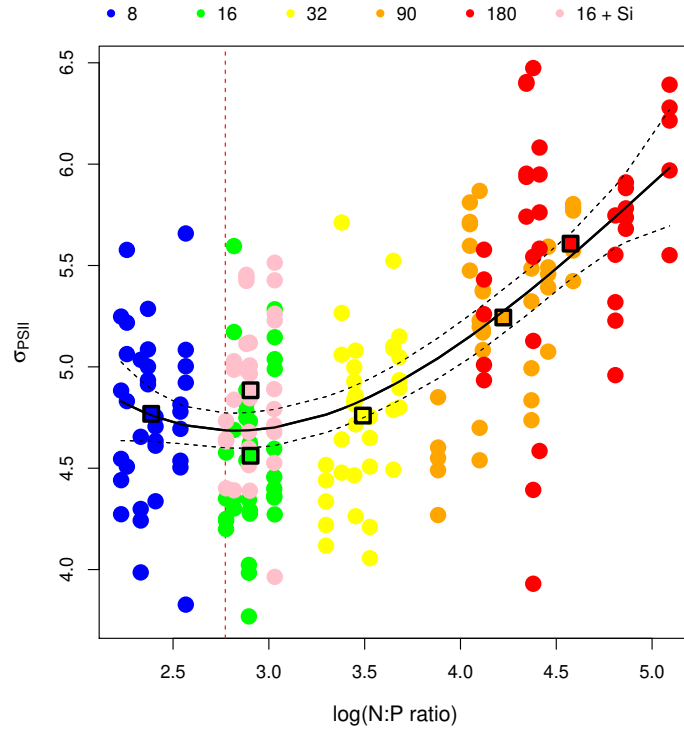


FIGURE 54 – Relationship between the cross section functionnal absorption (σ_{PSII}) and the log N:P value. Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16) the horizontal black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.

Chapitre 6

Discussion générale

Comme tous les systèmes aquatiques fortement anthropisés, le continuum estuaire-baie de la Seine est sous l'influence d'un très large bassin versant enrichi en sels nutritifs par les apports agricoles, industriels et urbains, ce flux représente en 2020, 2000 t de phosphates et 80 000 t de nitrates par an. Ces apports entraînent un excès de N et de P qui va affecter tout le continuum en provoquant une augmentation de la production et de la biomasse du phytoplancton. Ce mécanisme est le moteur de l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques qui peut aller jusqu'à des dégradations et perturbations profondes des systèmes et donc des services écosystémiques qu'ils procurent. Pour lutter contre ces mécanismes, depuis la fin du vingtième siècle et surtout depuis les années 2000 avec la mise en place de la DCE (Directive Cadre sur l'Eau), un abattement des concentrations en phosphates a été réalisé de manière efficace dans l'estuaire de la Seine. Cependant, les concentrations en nitrates restent très élevées entraînant alors un déséquilibre du ratio N:P et une profonde dystrophie le long du continuum. Le déséquilibre N:P se répercute ainsi jusqu'à la baie.

Le continuum Seine représente une zone d'intérêt socio-économique et écologique majeure. Jusque dans années 90 des hypoxies sévères (Meybeck et al., 2018) pouvaient toucher l'estuaire de Seine. L'abattement du P a significativement amélioré l'état du système en limitant l'eutrophisation. Néanmoins des questions importantes se posent sur la trajectoire de ce système dans ce contexte dystrophique, sur sa capacité productive et fonctionnelle pour les niveaux trophiques supérieurs, sur sa réponse aux changements globaux et sur les potentielles restaurations à mettre en place pour améliorer le fonctionnement et l'équilibre du système. Les communautés phytoplanctoniques étant le premier compartiment écologique affecté par ces déséquilibres, le travail présenté ici s'est attaché par le couplage d'approches expérimentales et d'observation *in situ* à explorer et surtout à comprendre le comportement de ce compartiment à cette dystrophie.

Pour étudier les effets des modifications de la distribution des sels nutritifs sur les communautés phytoplanctoniques et sur la fonction de production primaire plusieurs études sont couplées dans cette thèse : campagnes de mesures sur le continuum, expériences d'incubations, études d'efflorescences grâce des mesures automatisées à haute fréquence (bouée SMILE). Toutes ces études reprennent les mêmes axes d'étude en se basant sur la physiologie, la photosynthèse, la structure de communauté en rapport avec la distribution des sels nutritifs.

De manière générale, les expériences et observations montrent un lien fort entre les équilibres des sels nutritifs particulièrement celui du N et du P et les structures de communautés et leurs dynamiques ainsi que sur la production primaire. Dans un écosystème changeant, il est indispensable de comprendre ces processus afin de mieux appréhender les conséquences.

6.1 facteur de contrôle en estuaire de Seine

L'estuaire de Seine a connu une période d'eutrophisation avec des efflorescences massives récurrentes dépassant les 100 μg de chl *a*. Avec la chute des concentrations en phosphates, le ratio N:P a quintuplé entre les années 1990 et 2010 (passant d'une moyenne annuelle de 20 à 100). Il y a donc une transition d'un système avec des excès en nutriment mais relativement équilibré ($N:P \approx 16$) à un état déséquilibré ($N:P \gg 16$). La conséquence historique de ce changement est claire : une baisse immédiate et pérenne de la biomasse phytoplanctonique. La baisse semble donc avoir réduit l'eutrophisation et restaurer en partie la qualité de l'estuaire en empêchant la venue d'hypoxie dramatique pour la faune.

Cependant les campagnes dans l'estuaire mettent en lumière des pics de concentration en chl *a* qui n'ont pas été mesurés depuis les années 2000. Even et al. (2007) concluaient que les diminutions en N et en P n'étaient pas suffisantes et que la Seine restait vulnérable à l'eutrophisation malgré une amélioration de certains indicateurs (notamment l'oxygène). A l'exception d'une période en 2019 où ont été mesurées des valeurs d'oxygène indiquant une hypoxie ($< 2 \mu\text{g.l}^{-1}$) au niveau de Tancarville, peu de données supportent un état d'eutrophisation dans l'estuaire. De plus Tancarville se trouvant dans la zone maximale de turbidité (MTZ) (Le Hir et al., 2001) et les facteurs de baisse d'oxygène pouvant parfois être complexes (Li et al., 2020b) ces baisses ne sont donc peut être pas liées aux mécanismes d'eutrophisation mais au fonctionnement normal d'un bouchon vaseux. Nos mesures comme les mesures historiques montrent que la "zone critique de l'efflorescence" se trouve à l'amont vers les stations Duclair et la Bouille où aucune baisse drastique d'oxygène n'a été constatée ces dernières années.

Quels constats pouvons-nous tirer de notre étude ? Est-ce que les réductions de phosphates ont jouées sur les mécanismes de limitation du phytoplancton en sels nutritifs en estuaire ? Seule une limitation claire en silice a été mesurée, même sur les périodes d'efflorescences importantes, les concentrations en phosphates ne descendent pas en-dessous de niveaux potentiellement limitants ($< 3 \mu\text{mol.l}^{-1}$), les valeurs de nitrates sont en revanche clairement en excès. Une limitation nutritionnelle de la croissance du phytoplancton par la silice n'est pas inconcevable dans un estuaire eutrophisé (Wu & Chou, 2003) mais la corrélation historique entre les baisses de chl *a* et celles des phosphates montrent une limitation en P des communautés phytoplanctoniques pendant la période productive. Y a-t-il un paradoxe ? La dynamique des phosphates est complexe et le cycle biogéochimique est particulièrement difficile à appréhender dans les systèmes très dynamiques comme les estuaires. Nous avons lors de nos travaux dans l'estuaire eu accès uniquement à mes mesures discrètes de P lors de campagne ponctuelle contrairement à la baie où des mesures à haute fréquence de sels nutritifs nous ont permis de mettre en évidence l'intérêt de telles mesures. Cette absence de données haute fréquence dans un estuaire très dynamique nous donne une image tronquée de la dynamique de cet élément et des couplages avec le com-

partiment phytoplanctonique. De plus, la dystrophie causée par le haut rapport N:P loin des valeurs optimales (Hao et al., 2017) pourrait limiter indirectement la consommation de phosphates en sélectionnant des populations nitrophiles avec une faible affinité pour le P, cette hypothèse reste à explorer. La limitation en silice ne semble elle pas être un facteur majeur de contrôle de la production globale dans l'estuaire de Seine et n'explique pas la trajectoire historique observée. Les différentes populations que nous avons observées sont capables de soutenir des hautes valeurs de productivité. Cette limitation est par contre le déclencheur de la succession des communautés de phytoplancton et joue un rôle essentiel dans la dynamique saisonnière de l'estuaire.

La structure des communautés du phytoplanctoniques a été peu étudiée dans l'estuaire de Seine, les travaux de cette thèse contribuent donc à donner des informations sur ce compartiment. Garnier et al. (1995) décrivaient dans la Seine en 1990, une domination marquée par une succession de diatomées - Chlorophycées avec une absence de cyanobactérie et une présence occasionnelle de Cryptophytes. Ce schéma de succession de diatomées à Chlorophytes est courant dans les estuaires des milieux tempérés (Moorhouse et al., 2018). L'analyse des communautés phytoplanctoniques en estuaire de Seine par une méthode semi-automatisée (cytométrie en flux), 30 ans plus tard, permet de montrer le même schéma : domination des diatomées puis une succession vers les Chlorophytes alors que les Cryptophytes ne sont qu'occasionnellement observées et les cyanobactéries peu présentes. La succession est déclenchée par une consommation de la silice augmentant le rapport $N:Si$ lors des efflorescences de diatomées ce qui limite leur développement (Makareviciute-Fichtner et al., 2021). Ce processus de succession de diatomées à chlorophytes dans des conditions dystrophiques a été observé dans d'autres milieux (Domingues et al., 2005). L'absence apparente de cyanobactéries dans les communautés n'est pas surprenante vu qu'elles sont peu adaptées au milieu turbulent (Reynolds, 1984), et ce malgré les hauts ratios N:P et N:Si qui les favoriseraient au profit des autres groupes (Gobler et al., 2016). Cependant, des espèces sont présentes dans la Seine parmi lesquelles des espèces toxiques (Catherine et al., 2008; Druart & Briand, 2002; Via-Ordorika et al., 1998) et des transferts peuvent s'effectuer entre les fleuves et les estuaires (Bormans et al., 2020).

Ces limitations en sels nutritifs ne sont pas le facteur majeur de contrôle de la production dans l'estuaire. L'accès à la lumière c'est à dire la combinaison de l'irradiance et de la turbidité est le facteur de contrôle majeur de la production primaire phytoplanctonique dans de nombreux écosystèmes côtiers (Dokulil, 2014). Un autre facteur, le débit est souvent cité parmi les facteurs majeurs de contrôle de la production et de la respiration dans les cours d'eau (Bernhardt et al., 2022). Durant la période productive, si le débit est faible, le temps de résidence des particules augmente laissant plus de temps aux populations phytoplanctoniques pour croître. La biomasse s'accumule, les efflorescences se déclenchent (Bowes et al., 2016), permettant ainsi l'augmentation des concentrations en toxines lors des HABs par exemple (Bargu et al., 2016). D'autres systèmes peuvent présenter la dynamique inverse avec l'augmentation des efflorescences et de la consommation des nutriments associées à une augmentation du temps de résidence (Beaver et al., 2013;

Koch et al., 2004), comme décrit ci-après au niveau de la baie de Seine. Les efflorescences d'ampleur mesurées dans la Seine en 2020 correspondent à la période avec le débit le plus faible mesuré sur cet intervalle de 3 ans. Un débit suffisamment important c'est à dire où le taux de croissance du phytoplancton ne peut dépasser la dispersion hydrodynamique (Dugdale et al., 2012) durant les périodes critiques, empêcherait donc des efflorescences trop extrêmes comme observé l'été 2021. Cependant, il faut considérer le débit dans le cadre du continuum en entier, or un débit important durant la période productive va engendrer un apport plus important de nutriments dans la baie et favoriser des efflorescences (Serre-Fredj et al., 2021) comme observé en 2016 lors d'une crue exceptionnelle en juin qui a entraîné une efflorescence d'ampleur dans le panache de la seine. La position de efflorescence dans le système sur le continuum baie-estuaire dépend alors du débit (Iriarte et al., 2017). La succession dans l'estuaire est aussi fonction du débit, quand le débit diminue l'apport en silice diminue en même temps que la consommation augmente avec une augmentation de biomasse. La succession est donc déclenchée (Chan & Hamilton, 2001; Chowdhury et al., 2017). Le contrôle du débit est d'ailleurs dans plusieurs systèmes comme un moyen efficace de gestion des efflorescences (Dugdale et al., 2012; Li et al., 2021b; Song et al., 2021).

Dans l'estuaire de Seine, l'effet de l'eutrophisation a été grandement réduit et les communautés du phytoplancton ne semblent pas avoir subies de grandes modifications. Qu'entraînerait une réduction supplémentaire du P ? Dans l'Estuaire nos mesures ne montrent pas un lien direct entre le P et les efflorescences phytoplanctoniques, le lien historique entre la biomasse et les concentrations en P démontre un lien existant, l'hypothèse mise en avant serait un contrôle par la stoechiométrie des nutriments et non par les concentrations absolues. Dans la baie d'après Passy et al. (2016) une réduction supplémentaire d'un facteur 5 entraînerait une diminution d'un facteur 3 des dinoflagellés et donc potentiellement des HABs. Nos résultats montrent un important contrôle du ratio N:P sur la structure de taille de la communauté phytoplanctonique dans la baie pouvant affecter les réseaux trophiques. Les systèmes côtiers étant en permanence affectés par les arrivées de l'estuaire (Watanabe et al., 2017), il est nécessaire de considérer tout le continuum. Or des réductions supplémentaires dans l'estuaire pourraient aggraver la dystrophie et avoir un effet sur le transport de N dans le système côtier (Ní Longphuirt et al., 2016) en limitant le "filtre" estuarien qui réduit les sels nutritifs transmis à la Baie via la consommation biotique. Enfin il faut prendre en compte l'augmentation d'événements de sécheresses et de crues liée au changement climatique qui affectera les fleuves européens dans le futur (Blöschl et al., 2019). Les projections montrent que pour la Seine, le débit baissera pouvant alors augmenter la fréquence des efflorescences massives accentuant le contrôle du temps de résidence sur le fonctionnement le système et l'export des sels nutritifs (Ducharme, 2008; Flipo et al., 2021).

6.2 Limitation et dystrophie en Baie de Seine

La baie de Seine est sous l'influence des rivières locales et de la Seine (Lemesle et al., 2015; Serre-Fredj et al., 2021), la distribution et la concentration des sels nutritifs dans le système est en fonction des arrivées d'eau douce plus riche. Les résultats de cette thèse que ce soit via les expériences d'enrichissements et par observation du milieu, démontrent qu'une co-limitation N et P régit la Baie. Cette co-limitation dépend des arrivées et est donc dynamique en fonction de la stoechiométrie, le rapport N:P moyen en baie de seine (N:P = 30) traduit un déséquilibre en faveur de la limitation en P plus récurrent.

Mais l'influence des apports d'eau douce dans le système ne se limite pas seulement à un ajout de sels nutritifs. Les propriétés physiques différentes des masses d'eau douce réduisent la turbulence verticale, stratifient la colonne d'eau et favorisent le développement d'efflorescences (Byun et al., 2005). Cette configuration correspond exactement au déclenchement de l'efflorescence de *L. chlorophorum* en 2019 où il à été observé une augmentation de la température, une stratification et une baisse de la salinité (Serre-Fredj et al., 2021).

Avec la dystrophie caractérisée par les rapports N:P élevés en baie de Seine, les populations phytoplanctoniques sont soumises à une limitation en P. Les communautés peuvent s'adapter à cette limitation en phosphate (Cáceres et al., 2019). En cas de limitation de P inorganique, la part organique peut être utilisée, la mixotrophie est un moyen de compenser le manque de phosphore inorganique (Fischer et al., 2017; Li et al., 2000). La reminéralisation du P organique (DOP) via l'activité de la phosphatase alcaline (APA) peut aussi être employée. L'activité de la phosphatase alcaline a mis en évidence l'accès à du P lors des expériences d'enrichissement (Serre-Fredj et al., 2022, 2021). Le phosphore organique dissous (DOP) peut représenter dans certains systèmes une majorité du stock (Fitzsimons et al., 2020; Mather et al., 2008). Il a été montré que l'utilisation de l'APA dans le Golfe de Gascogne par exemple représentait une importante source de P minéral (Labry et al., 2005). La diversité de la communauté va aussi jouer sur l'efficacité de l'APA, les dinoflagellés présentent des différences caractéristiques génétiques particulières pour la production d'APA (Lin et al., 2015, 2012) ce qui peut favoriser certaines espèces comme par exemple *K. brevis* génératrice d'HABs (Lin et al., 2011). Enfin, La prise en compte des apports de P via les sédiments pourrait aussi permettre de mieux appréhender les apports de P. Une reminéralisation importante de cet P organique au niveau des sédiments de la baie de Seine doit être présent (Andrieux & Aminot, 1997) mais est mal considéré. Les mécanismes de reminéralisation dans les sédiments et de la production d'APA peuvent aussi être couplés (Li et al., 2020a). L'utilisation du DOP doit être pris en compte car augmente la production primaire et la pompe biologique (Letscher & Moore, 2015).

Mais malgré ces adaptations et acclimatations à un milieu déséquilibré, ce travail a montré qu'un ratio N:P proche de Redfield (N:P $\approx$ 16) constitue l'équilibre idéal pour

la croissance et la production primaire des communautés phytoplanctonique en baie de Seine (Serre-Fredj et al., 2022).

L'impact des changements dans la distribution des sels nutritifs sur la structure des communautés microphyplanctoniques montre de la période de 1992 à 2011 une augmentation des biomasses de certains groupes comme les dinoflagellés (Hernández-Fariñas et al., 2014; Widdicombe et al., 2010) puis une stabilisation globale (2008 - 2019) de la structure des communautés (Lefran et al., 2021). Ce changement de communautés peut constituer l'une des modifications majeures du système liées au changement stœchiométriques (Jiang et al., 2019; Zhou et al., 2017). De plus, l'augmentation des dinoflagellés au profit des diatomées avec l'augmentation de la fréquence des efflorescences peut être amplifiée par le changement climatique (Aquino-Cruz & Okolodkov, 2016; Xiao et al., 2018). Ce schéma de transition de population se retrouve dans d'autres écosystèmes dûs à la montée de la température et à la stratification de la colonne (Fischer et al., 2020).

Or les données SOMLIT de la baie de Seine permettent déjà de montrer une montée stable de $0,08\text{ }^{\circ}\text{C.an}^{-1}$ entre 2007 et 2020 ($p = 0,0063$) ce qui pourrait accentuer le phénomène. Concernant la biomasse les résultats de cette thèse semblent indiquer qu'avec la dystrophie la tendance de la biomasse est à la décroissance dans la baie et dans l'estuaire (Hernández-Fariñas et al., 2014) ce résultat contraste avec les prévisions des modèles trophiques dans la Baie qui prévoient une augmentation de la biomasse phytoplanctonique avec le changement climatique (Bourdaud et al., 2021). Dans un contexte de réduction supplémentaire des apports de phosphates, les projections de modélisation estiment que la concentration en dinoflagellés et la fréquence des efflorescences dont potentiellement des HABs seraient grandement réduites et n'affecteraient que de manière minimale les populations de diatomées (Passy et al., 2016).

Le changement de la structure de communautés entre les diatomées et le dinoflagellés parfois simplifié avec l'indicateur du ratio dinoflagellés/diatomées (Wasmund, 2017) est récurrent dans la problématique d'eutrophisation et de dystrophie, l'étude de l'évolution de ces populations pourrait constituer un élément de suivis des conséquences dans le système. Cependant si le but est de réduire l'occurrence des HABs qui nuisent aux activités anthropiques et à l'état écologique du système, réduire seulement les populations de dinoflagellés ne suffit pas. Plusieurs espèces de diatomées comptent parmi les productrices de HABs, il faut alors considérer de réduire le N et le P (Paerl et al., 2018).

Il y a une nécessité de ne pas considérer la problématique d'eutrophisation comme uniquement la conséquence de l'excès de sels nutritifs (Nixon, 2009). D'autres facteurs environnementaux externes peuvent entrer en synergie avec cette problématique, tels que les interactions avec les contaminants (Hannah et al., 2022), les modifications liées au changement climatique, ou différentes pressions anthropiques qui pourraient accentuer cette problématique. L'eutrophisation est l'une des problématiques les plus surveillées en Europe dans les écosystèmes côtiers (ex. HELCOM - Mer Baltique ; OSPAR ; Descripteur

5 DCSMM etc.) (Poikane et al., 2020) mais la restauration n'est pas aisée. Certaines solutions se basent sur un changement du modèle de consommation ou de production de la nourriture pour réduire les sources de N (Billen & Garnier, 2021; Fresán et al., 2019; Fulweiler et al., 2012) en réduisant la consommation de viande, ou en réduisant l'agriculture avec intrants. Des méthodes comme la récupération du P des eaux usées, en réponse à la croissance du coût du P minier représenterait alors un intérêt économique incitant à la réduction du P (Mayer et al., 2016).

6.3 Indicateur de dystrophie

Les travaux de cette thèse permettent de caractériser des méthodologies et des indicateurs pour l'évaluation des milieux eutrophisés. La fluorimétrie variable et la cytométrie en flux sont deux méthodes particulièrement adaptées à l'étude de l'effet de la dystrophie sur les communautés de phytoplanctons. Combinés à des mesures de TEP ou d'APA qui apportent des informations supplémentaires sur le lien entre la physiologie des populations et sur les limitations qu'elles subissent.

La fluorimétrie variable représentée par les techniques de PAM, de FRRf et de STAF dans cette thèse permet d'estimer la production primaire de manière non destructive, rapide, *in situ* à l'aide de capteurs. Dans un contexte d'eutrophisation, cette méthode permet non seulement de quantifier la production primaire nécessaire à la quantification d'état d'eutrophisation mais aussi de mesurer des stress des communautés phytoplanctoniques (Sylvan et al., 2007). Les paramètres photosynthétiques estimés par les méthodes de fluorimétrie vont permettre d'informer sur l'état physiologique, les capacités d'absorption de la lumière, et les mécanismes de photo inhibition et de photorégulation. Ce grand éventail de paramètres permet d'avoir une vision bien plus complète que des méthodes plus classiques même si les unités en "moles d'électrons" sont souvent complexes à manipuler et demande à être converties de manière non triviale en unité plus conventionnelle (carbone ou oxygène). Parmi ces paramètres, le quantum maximum d'efficacité du PSII (F_v/F_m) est le plus utilisé et est largement utilisé comme indicateur physiologique de l'état des communautés phytoplanctonique et peut s'appliquer à la caractérisation des stress nutritifs (Park et al., 2002; Wu et al., 2012) par exemple mais son interprétation demande de la prudence (Parkhill et al., 2001).

Le paramètre d'absorption fonctionnel de la lumière σ_{PSII} pourrait aussi constituer un bon indicateur de stress nutritionnel. Les incubations réalisées au cours de la thèse montrent un lien entre la limitation en sels nutritifs et l'augmentation du σ_{PSII} . Dans le milieu naturel, la bouée SMILE a mesuré plusieurs efflorescences sur la période 2019-2021. Lors de la phase de chute de ces efflorescences associées à des limitations en sels nutritifs, une baisse du σ_{452} est mesurée, l'inverse des résultats d'incubations. La difficulté d'interprétation de ce paramètre se retrouve aussi dans la littérature : baisse liée aux enrichissements (Sylvan et al., 2007), ou des augmentations (Song et al., 2019; Stramski et al.,

2002), ou les deux (Li et al., 2021c). Plusieurs facteurs se retrouvent sûrement confondus venant alors brouiller l'information : la grande densité de cellules phytoplanctoniques augmenterait les effets d'auto-ombrage (Agustí, 1991). Les longueurs d'ondes de mesures vont aussi affecter les valeurs en fonction de la composition pigmentaire de la communauté. Les fluorimètres multispectraux permettent alors d'avoir des valeurs de σ_{PSII} à plusieurs longueurs d'onde et donc d'estimer un indicateur de diversité fonctionnel sur la capacité à absorber la lumière à plusieurs longueurs d'onde. Cela revient à considérer des niches le long du spectre lumineux (Behl et al., 2011).

Cependant, l'utilisation de fluorimétrie variable doit se faire en complément d'autres méthodes pour ne pas mal interpréter des variations dues à la physiologie ou à l'écosystème (Prasil et al., 2008). Des imprécisions du calcul d'ETR liées à l'estimation du coefficient d'absorption affectent cette méthode (Camargo et al., 2022). Cependant, l'utilisation de l'algorithme d'Oxborough (Oxborough et al., 2012) qui estime l'absorption grâce au F_o et un coefficient spécifique à l'instrument (K_c) est le plus adapté aux mesures *in situ* autonomes (Silsbe et al., 2015). De la même manière que la mesure de certains paramètres supplémentaires comme le $\phi_{e,c}$ qui peut être très variable en fonction des systèmes (Hughes, 2018; Lawrenz et al., 2013; Napoléon, 2012) peuvent permettre alors de rendre les estimations de production plus robustes (Morelle & Claquin, 2018; Morelle et al., 2018; Napoléon, 2012). Mais la fluorimétrie variable doit être couplée à d'autres méthodes puisque Les changements de communautés doivent être pris en compte lors de l'interprétation de la physiologie des communautés (Suggett et al., 2009).

La cytométrie en flux permet de donner des éléments de réponses aux questions de structures de communautés. Les résultats de cytométrie ne permettent pas de mesurer la diversité spécifique mais des indicateurs de diversité fonctionnelle (Salmaso et al., 2015) permettant de comprendre la dynamique phytoplanctonique (Jacquet et al., 2006; Moorhouse et al., 2018). Que ce soit par rapport aux groupes discriminés par la taille et la fluorescence (*Synechococcus*, cryptophyte, picoeucaryotes, nanoeucaryotes, microphytoplacton) ou bien en structure de taille qui sont les deux méthodes employées dans cette thèse, les informations sont largement suffisantes pour analyser des changements de population, des successions ou bien de la dominance de groupes particuliers.

L'utilisation de la prise d'image de cellule par les cytomètres constitue un moyen supplémentaire d'avoir des informations sur les groupes discriminés, la prise d'image a permis d'identifier la population de *L.chlorophorum* lors de l'efflorescence de l'été 2019 (Serre-Fredj et al., 2021). Ces méthodes de prises d'image couplées à des méthodes de machine learning permettent d'augmenter la résolution d'identification (Dunker, 2019, 2020; Fischer et al., 2020), ce qui pourrait permettre la détermination d'espèces cibles comme celles produisant des HABs. Une autre information donnée par la cytométrie, est la taille de chaque particule, qui peut ensuite être convertie en biovolume donnant des informations supplémentaires sur la structure des populations cytométriques (Saccà, 2017). Du

fait de la diversité des formes du phytoplancton (Hillebrand et al., 2022, 1999) l'estimation du biovolume par cette méthode peut-être être approximative mais de nouvelles méthodes permettent néanmoins d'optimiser cette estimation (Cael & Strong, 2018; Gualda et al., 2017). Pour aller plus loin dans l'étude de la dystrophie sur le phytoplancton, la cytométrie peut permettre des mesures de quota cellulaire en N (Malerba et al., 2016) et peut être couplée à la fluorimétrie active pour calculer le F_v/F_m et le σ_{PSII} par cellule (Olson et al., 1996; Perry & Porter, 1989).

D'autres paramètres physiologiques se sont révélés intéressants pour qualifier un état de stress nutritifs lié à la dystrophie dans cette thèse : L'activité de la phosphatase alcaline et la production de TEP. Les mesures d'activité de la phosphatase alcaline peuvent servir d'indicateur de la limitation en P (Elser & Kimmel, 1986; Yang et al., 2020) mais de manière plus générale d'indicateur de limitation en sels nutritifs (Fuentes et al., 2014; Rose & Axler, 1997) ou de dystrophie via les ratios N:P (Serre-Fredj et al., 2022). Il est également important de prendre en compte que les micro-organismes hétérotrophes qui sont aussi capables d'en produire même si généralement l'APA est contrôlé par le phytoplancton (Veldhuis et al., 1987). Ce paramètre peut aussi être utilisé pour la prédiction d'efflorescences (Ma et al., 2019) en plus d'affiner notre compréhension des phénomènes et régulations se mettant en place pendant ces épisodes (Qin et al., 2021; Serre-Fredj et al., 2021). Il faut néanmoins faire attention car l'utilisation de la phosphatase alcaline peut aussi servir d'autres fonctions, comme au recyclage du carbone plutôt que d'obtenir du P (Cao et al., 2010). De nouvelles méthodes permettant d'affiner la précision des mesures (Sun et al., 2020) ou même de coupler à de la cytométrie en flux des mesures d'APA par cellule (Diaz-de Quijano et al., 2020) sont à développer. La facilitation des méthodologies de détection pourrait aussi permettre la généralisation de ce paramètre (You et al., 2020) dans les suivis récurrents. La prise en considération de la différence APA intra et extracellulaire pourrait aussi permettre de mieux comprendre la physiologie des cellules en condition dystrophique Zhang et al. (2020b).

Les mesures de concentration en TEP permettent d'avoir des informations sur de nombreux processus dans un système. La production de TEP est connue pour favoriser l'agrégation des cellules et donc d'accroître la sédimentation des cellules (Chen et al., 2021) et ainsi de jouer un rôle dans la dynamique des fins d'efflorescence (Engel, 2000). De plus, les milieux turbulents comme la baie de Seine seraient des milieux favorables à la production de TEP (Burns et al., 2019; Morelle et al., 2017). Les mesures de TEP peuvent aussi s'interpréter comme un indicateur physiologique pour des stress oxydatifs (Callieri et al., 2019) et nutritifs. Quand le N et le P viennent à manquer le carbone inorganique dissous (DIC) consommé qui ne peut être fixé va être excrété sous forme de TEP, c'est le débordement de carbone (*carbon overflow*). Ainsi que ce soit en concentration (Corzo et al., 2000; Deng et al., 2016) ou bien par rapport au ratio N:P (Engel et al., 2015; Mari et al., 2005; Pandey & Pandey, 2015) les mesures de TEP peuvent permettre de mesurer un stress lié aux nutriments. Les TEPS produits par *L. chlorophorum* ont probablement

influencé la dynamique de l'efflorescence. Les incubations ont montré une augmentation des TEPs liée aux limitations en sels nutritifs qui ont pu favoriser la sédimentation rapide de l'efflorescence ce qui pourrait dans d'autres écosystèmes moins dynamiques accélérer les mécanismes d'eutrophisation. Mais plus que des indicateurs physiologiques les TEP sont importants dans les cycles microbiens (Engel et al., 2020) et dans le cycle du carbone (Claquin et al., 2008; Mari et al., 2001; Quigg et al., 2021) pouvant constituer jusqu'à 80 % du cycle du POC dans certains milieux (Lee et al., 2020). Enfin des avancées avec de nouvelles techniques de mesure des TEP et de leurs précurseurs (Sim et al., 2019; Villacorte et al., 2015) pourraient aider à mieux comprendre la physiologie du phytoplancton et son impact sur les cycles biogéochimiques.

La méthode des incubations permet de contrôler certains paramètres pour étudier des processus spécifiques, cette méthode comporte néanmoins certains biais qu'il convient de contrôler comme notamment l'effet bouteille (bottle-effect) (Hammes et al., 2010) ou la variation de volume utilisée qui peut impacter l'expérience (Gieskes et al., 1979; Nogueira et al., 2014) ou la méthode de prélèvement (Majaneva et al., 2009). Mais en terme de biais méthodologique lors des incubations le bottle effect semble moins affecter les populations que la méthode de pré-filtration employée (Nogueira et al., 2014), dans notre cas, une filtration de 100 μm a été employée ce qui a pu favoriser certains groupes en enlevant des prédateurs spécifiques. Le temps d'incubation doit être suffisamment important pour étudier le processus choisi (Calvo-Díaz et al., 2011), pour les nutriments 4-5 jours semblent suffisants pour les mesures (Li et al., 2021c). Par rapport à des volumes plus gros (mésocosmes), les microcosmes permettent de multiplier les réplicats et les conditions en suivant des gradients ce qui fiabilisent et aident l'interprétation des résultats.

6.4 Interaction dystrophie - Biodiversité - Production

Que ce soit dans l'estuaire, dans la Baie via les mesures *in situ* ou dans les incubations, la distribution des sels nutritifs et la dystrophie contrôlent la dynamique, la structure et la production des communautés de phytoplanctons.

Dans le cas de l'efflorescence de *L.chlorophorum* l'arrivée de sels nutritifs permet une croissance et une augmentation de la production, jusqu'à ce que la consommation amène un déséquilibre dû au manque de P qui entraîne la chute de la production et la fin de l'efflorescence. Le même constat est tiré des expériences d'incubation : le ratio N:P de 16 est le ratio optimal et tout écart entraîne une baisse de la production sous forme de biomasse (chl *a*) et de capacité photosynthétique qui y est liée (JV_{II}). Dans l'estuaire, la réduction historique de la biomasse témoigne de l'effet de l'augmentation du rapport N:P comme montré dans d'autres études (Song et al., 2019). Mais l'effet de la dystrophie sur la production s'exprime par la dégradation des paramètres photosynthétiques : le F_v/F_m (Qi et al., 2013; Saeck et al., 2016), σ_{PSII} , mais aussi le E_k , le α . Tous ces paramètres sont affectés par la limitation et la dystrophie en baie de Seine, en Estuaire et dans les incubations.

Les enrichissements et la dystrophie vont aussi affecter les communautés phytoplanc-toniques. De manière générale, les rapports élémentaires vont changer les communautés (Bandyopadhyay & Biswas, 2020; Filiz et al., 2020; Leruste et al., 2019; Oseji et al., 2018) et peuvent favoriser certaines populations. Les dinoflagellés dépendent de la distribution des phosphates (Radi et al., 2007), un milieu limité en P risque donc de subir une transition de diatomées aux dinoflagellés qui pourrait aggraver les risques liés à l'eutrophisation de par leur toxicité et leur capacité à s'enkyster dans les sédiments (Spilling et al., 2018). L'indicateur diatomée/dinoflagellé est d'ailleurs utilisé pour évaluer un bon état écologique (Wasmund, 2017). Cette augmentation de dinoflagellés est la tendance observée dans la Manche (Hernández-Fariñas et al., 2014) et c'est aussi la population qui a été favorisée par le milieu dystrophique lors de l'efflorescence de *Lepidodinium chlorophorum* décrit dans ce travail. Les sels nutritifs vont affecter la structure de taille du phytoplancton (Alejandra Paredes & Montecino, 2011) qui elle même affecte la résilience des écosystèmes (Baho et al., 2020). Dans les incubations les conditions de ratio N:P vont aussi affecter la communauté avec une promotion des grosses cellules (nanoeucaryotes et microphytoplancton) pour des rapports N:P proche de l'équilibre de Redfield et une baisse du microphytoplancton pour des rapports N:P élevés.

Enfin ces résultats supportent aussi la théorie du lien positif entre la biodiversité et les fonctions de l'écosystème (BEF) et plus encore le lien entre l'écologie stochiométrique et la BEF (Hillebrand et al., 2014). Dans les incubations du chapitre 5 plusieurs indicateurs de diversité fonctionnel montrent une décroissance en même temps que la production. La diversité fonctionnelle permet généralement de mieux prédire un écosystème que la diversité

spécifique (Abonyi et al., 2018; Weithoff et al., 2001) bien que l'inverse soit aussi reporté dans certains systèmes (Santos et al., 2015). Les limitations en sels nutritifs contrôlent la diversité fonctionnelle (Wang et al., 2020) et la diversité fonctionnelle peut contrôler la limitation en sels nutritifs (Schulhof et al., 2022) et la réponse à ces limitations (Hulot et al., 2000). Ce lien entre la production et la diversité se retrouve illustré dans les incubations avec des rapports N:P élevés et des baisses de la production primaire, de l'équitabilité de la structure de populations et une spécialisation de l'absorbance fonctionnelle sont observées.

L'efficacité d'utilisation de la ressource (RUE) illustre le lien entre la production et les nutriments. La RUE est adaptée à l'étude des problématiques d'eutrophisation (Yang et al., 2021, 2022). Usuellement seulement un sel nutritif est utilisé dans le calcul du RUE, seulement pour mieux capturer la complexité de certains systèmes d'autres variables doivent être inclus (Han et al., 2016; Hodapp et al., 2019) comme la stochiométrie (Serre-Fredj et al., 2022). L'utilisation d'autre proxy de production que la chl *a* pourrait permettre de mieux appréhender certains fonctionnements, le JV_{II} pourrait se révéler plus juste que la chl *a*. La RUE est affectée par les changements de communautés (Filstrup et al., 2014; Paczkowska et al., 2019), or la diversité fonctionnelle et l'équitabilité sont corrélées positivement avec le RUE (Filstrup et al., 2014; Ye et al., 2019) et la stabilité du système (Ptacnik et al., 2005). La diversité permet même dans certains cas de maintenir une RUE élevée malgré des rapports N:P déséquilibrés (Gerhard et al., 2022), même si ce phénomène a ses limites (Gülzow et al., 2019). La fonction primordiale d'utilisation de la ressource est donc largement influencée par la diversité fonctionnelle. Une optimisation des fonctions de l'écosystème par la diversité fonctionnelle conduit enfin à une stabilité augmentée de ces systèmes (da Silva et al., 2021; Vallina et al., 2017). La prise en compte de l'effet de la dystrophie sur le phytoplancton associé à celui du changement climatique est ainsi essentiel pour la gestion des écosystèmes côtiers et la scénarisation de trajectoires.

Bibliographie

- Abad, D., Albaina, A., Aguirre, M., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Iriarte, A., Villate, F., & Estonba, A. (2016). Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy. *Marine Biology*, 163(7), 149.
- Abonyi, A., Horváth, Z., & Ptacnik, R. (2018). Functional richness outperforms taxonomic richness in predicting ecosystem functioning in natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology*, 63(2), 178–186.
- Agawin, N. S. R., Duarte, C. M., & Agustí, S. (2000a). Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 591–600.
- Agawin, N. S. R., Duarte, C. M., & Agustí, S. (2000b). Response of Mediterranean *Synechococcus* growth and loss rates to experimental nutrient inputs. *Marine Ecology Progress Series*, 206, 97–106.
- Agustí, S. (1991). Light environment within dense algal populations : cell size influences on self-shading. *Journal of Plankton Research*, 13(4), 863–871.
- Aissa-Grouz, N., Garnier, J., & Billen, G. (2018). Long trend reduction of phosphorus wastewater loading in the Seine : determination of phosphorus speciation and sorption for modeling algal growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23515–23528.
- Alejandra Paredes, M. & Montecino, V. (2011). Size diversity as an expression of phytoplankton community structure and the identification of its patterns on the scale of fjords and channels. *Continental Shelf Research*, 31(3), 272–281.
- Allakhverdiev, S. I., Thavasi, V., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Klimov, V. V., Ramakrishna, S., Los, D. A., Mimuro, M., Nishihara, H., & Carpentier, R. (2010). Photosynthetic hydrogen production. *Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews*, 11(2), 101–113.
- Allan, R. P., Hawkins, E., Bellouin, N., & Collins, B. (2021). IPCC, 2021 : Summary for Policymakers. Cambridge University Press. ISSN : 9000-0870.

- Allen, J. F. & Forsberg, J. (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science*, 6(7), 317–326.
- Almazán-Becerril, A. & García-Mendoza, E. (2008). Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico : A nutrient stress diagnostic tool? *Ciencias Marinas*, 34(1), 29–43. Number : 1.
- Aminot, A., Guillaud, J.-F., Andrieux-Loyer, F., Kérouel, R., & Cann, P. (1998). Apports de nutriments et développement phytoplanctonique en baie de Seine. *Oceanologica Acta*, 21(6), 923–935.
- Aminot, A., Guillaud, J.-F., & Kérouel, R. (1997). La baie de Seine : hydrologie, nutriments, chlorophille (1978-1994).
- Aminot, A. & Kérouel, R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines - Méthodes en flux continu*.
- Amorim, C. A. & Moura, A. d. N. (2021). Ecological impacts of freshwater algal blooms on water quality, plankton biodiversity, structure, and ecosystem functioning. *Science of The Total Environment*, 758, 143605.
- Anderson, D. M., Burkholder, J. M., Cochlan, W. P., Glibert, P. M., Gobler, C. J., Heil, C. A., Kudela, R. M., Parsons, M. L., Rensel, J. E. J., Townsend, D. W., Trainer, V. L., & Vargo, G. A. (2008). Harmful algal blooms and eutrophication : Examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae*, 8(1), 39–53.
- Anderson, D. M., Fensin, E., Gobler, C. J., Hoeglund, A. E., Hubbard, K. A., Kulis, D. M., Landsberg, J. H., Lefebvre, K. A., Provoost, P., Richlen, M. L., Smith, J. L., Solow, A. R., & Trainer, V. L. (2021). Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States : History, current status and future trends. *Harmful Algae*, 102, 101975.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication : Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25(4), 704–726.
- Andrieux, F. & Aminot, A. (1997). A two-year survey of phosphorus speciation in the sediments of the Bay of Seine (France). *Continental Shelf Research*, 17(10), 1229–1245.
- Aquino-Cruz, A. & Okolodkov, Y. B. (2016). Impact of increasing water temperature on growth, photosynthetic efficiency, nutrient consumption, and potential toxicity of *Amphidinium cf. carterae* and *Coolia monotis* (Dinoflagellata). *Revista de biología marina y oceanografía*, 51(3), 565–580.
- Arrigo, K. R. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437(7057), 349–355.

- Artioli, Y., Friedrich, J., Gilbert, A. J., McQuatters-Gollop, A., Mee, L. D., Vermaat, J. E., Wulff, F., Humborg, C., Palmeri, L., & Pollehne, F. (2008). Nutrient budgets for European seas : A measure of the effectiveness of nutrient reduction policies. *Marine Pollution Bulletin*, 56(9), 1609–1617.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplast : Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 601–639.
- Aubriot, L. & Bonilla, S. (2018). Regulation of phosphate uptake reveals cyanobacterial bloom resilience to shifting N :P ratios. *Freshwater Biology*, 63(3), 318–329. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/fwb.13066>.
- Azadi, F., Ashofteh, P.-S., & Chu, X. (2021). Evaluation of the effects of climate change on thermal stratification of reservoirs. *Sustainable Cities and Society*, 66, 102531.
- Azzaro, F. (2014). Automated Nutrients Analysis for Buoys in Sea-Water and Intercalibration. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 1(6), 315.
- Babin, M., André, M., & Real, G. (1994). An incubator designed for extensive and sensitive measurements of phytoplankton photosynthetic parameters. *Limnology and Oceanography*, 39(3), 694–702.
- Babin, M., Morel, A., Claustre, H., Bricaud, A., Kolber, Z., & Falkowski, P. G. (1996). Nitrogen- and irradiance-dependent variations of the maximum quantum yield of carbon fixation in eutrophic, mesotrophic and oligotrophic marine systems. *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers*, 43(8), 1241–1272.
- Baho, D. L., Drakare, S., Johnson, R. K., & Angeler, D. G. (2020). Phytoplankton size- and abundance-based resilience assessments reveal nutrient rather than water level effects. *Science of The Total Environment*, 746, 141110.
- Bandyopadhyay, D. & Biswas, H. (2020). Impacts of variable nutrient stoichiometry (N, Si and P) on a coastal phytoplankton community from the SW Bay of Bengal, India. *European Journal of Phycology*, 0(0), 1–16.
- Barber, J., Malkin, S., Telfer, A., Schreiber, U., Walker, D. A., & Osmond, C. B. (1989). The origin of chlorophyll fluorescence In vivo and its quenching by the photosystem II reaction centre. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 323(1216), 227–239. Publisher : Royal Society.
- Barbier, E. B. (2017). Marine ecosystem services. *Current Biology*, 27(11), R507–R510. Publisher : Elsevier.
- Barbier, E. B., Hacker, S. D., Kennedy, C., Koch, E. W., Stier, A. C., & Silliman, B. R. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), 169–193.

- Bargu, S., Baustian, M. M., Rabalais, N. N., Del Rio, R., Von Korff, B., & Turner, R. E. (2016). Influence of the Mississippi River on *Pseudo-nitzschia* spp. Abundance and Toxicity in Louisiana Coastal Waters. *Estuaries and Coasts*, 39(5), 1345–1356.
- Barros, M. P., Pedersén, M., Colepicolo, P., & Snoeijs, P. (2003). Self-shading protects phytoplankton communities against H₂O₂-induced oxidative damage. *Aquatic Microbial Ecology*, 30(3), 275–282.
- Basset, A., Elliott, M., West, R. J., & Wilson, J. G. (2013). Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 132, 1–4.
- Basu, S. & Mackey, K. R. M. (2018). Phytoplankton as Key Mediators of the Biological Carbon Pump : Their Responses to a Changing Climate. *Sustainability*, 10(3), 869. Number : 3 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Bauer, J. E., Cai, W.-J., Raymond, P. A., Bianchi, T. S., Hopkinson, C. S., & Regnier, P. A. G. (2013). The changing carbon cycle of the coastal ocean. *Nature*, 504(7478), 61–70.
- Baux, N., Pezy, J.-P., Bachelet, Q., Baffreau, A., Méar, Y., Poizot, E., Guyonnet, B., & Dauvin, J.-C. (2017). Soft bottom macrobenthic communities in a semi-enclosed Bay bordering the English Channel : The Rade de Cherbourg. *Regional Studies in Marine Science*, 9, 106–116.
- 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 Phytologist*, 181(2), 295–309.
- Beauvais, S., Pedrotti, M. L., Villa, E., & Lemée, R. (2003). Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 262, 97–109.
- Beaver, J. R., Jensen, D. E., Casamatta, D. A., Tausz, C. E., Scotese, K. C., Buccier, K. M., Teacher, C. E., Rosati, T. C., Minerovic, A. D., & Renicker, T. R. (2013). Response of phytoplankton and zooplankton communities in six reservoirs of the middle Missouri River (USA) to drought conditions and a major flood event. *Hydrobiologia*, 705(1), 173–189.
- Behl, S., Donval, A., & Stibor, H. (2011). The relative importance of species diversity and functional group diversity on carbon uptake in phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography*, 56(2), 683–694.
- Behrenfeld, M. J., Prasil, O., Babin, M., & Bruyant, F. (2004). In Search of a Physiological Basis for Covariations in Light-Limited and Light-Saturated Photosynthesis1. *Journal of Phycology*, 40(1), 4–25.

- Bender, M., Grande, K., Johnson, K., Marra, J., Williams, P. J. L., Sieburth, J., Pilson, M., Langdon, C., Hitchcock, G., Orchardo, J., Hunt, C., Donaghay, P., & Heinemann, K. (1987). A comparison of four methods for determining planktonic community production. *Limnology and Oceanography*, 32(5), 1085–1098.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P. G. (1989). Photoadaptation and the “Package” Effect in *Dunaliella Tertiolecta* (chlorophyceae)1. *Journal of Phycology*, 25(1), 70–78.
- Bernhardt, E. S., Savoy, P., Vlah, M. J., Appling, A. P., Koenig, L. E., Hall, R. O., Arroita, M., Blaszcak, J. R., Carter, A. M., Cohen, M., Harvey, J. W., Heffernan, J. B., Helton, A. M., Hosen, J. D., Kirk, L., McDowell, W. H., Stanley, E. H., Yackulic, C. B., & Grimm, N. B. (2022). Light and flow regimes regulate the metabolism of rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences.
- Billen, G. & Garnier, J. (2021). Nitrogen biogeochemistry of water-agro-food systems : the example of the Seine land-to-sea continuum. *Biogeochemistry*.
- Billen, G., Garnier, J., Némery, J., Sebilo, M., Sferratore, A., Barles, S., Benoit, P., & Benoit, M. (2007). A long-term view of nutrient transfers through the Seine river continuum. *Science of The Total Environment*, 375(1), 80–97.
- Blanchard, M., Teil, M. J., Carru, A.-M., Garban, B., Ollivon, D., Chesterikoff, A., & Chevreuil, M. (1999). Biota contamination by PCBs and trace metals in the freshwater estuary of the River Seine (France). *Hydrobiologia*, 400(0), 149–154.
- Blankenship, R. E. (2013). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. John Wiley & Sons.
- Bledsoe, E. L., Philips, E. J., Jett, C. E., & Donnelly, K. A. (2004). The relationships among phytoplankton biomass, nutrient loading and hydrodynamics in an inner-shelf estuary. *Ophelia*, 58(1), 29–47.
- Blöschl, G., Hall, J., Viglione, A., Perdigão, R. A. P., Parajka, J., Merz, B., Lun, D., Arheimer, B., Aronica, G. T., Bilibashi, A., Boháč, M., Bonacci, O., Borga, M., Čanjevac, I., Castellarin, A., Chirico, G. B., Claps, P., Frolova, N., Ganora, D., Gorbachova, L., Gül, A., Hannaford, J., Harrigan, S., Kireeva, M., Kiss, A., Kjeldsen, T. R., Kohnová, S., Koskela, J. J., Ledvinka, O., Macdonald, N., Mavrova-Guirguinova, M., Mediero, L., Merz, R., Molnar, P., Montanari, A., Murphy, C., Osuch, M., Ovcharuk, V., Radevski, I., Salinas, J. L., Sauquet, E., Šraj, M., Szolgay, J., Volpi, E., Wilson, D., Zaimi, K., & Živković, N. (2019). Changing climate both increases and decreases European river floods. *Nature*, 573(7772), 108–111.
- Boatman, T. G., Geider, R. J., & Oxborough, K. (2019). Improving the Accuracy of Single Turnover Active Fluorometry (STAF) for the Estimation of Phytoplankton Primary Productivity (PhytoPP). *Frontiers in Marine Science*, 6.

- Bormans, M., Savar, V., Legrand, B., Mineaud, E., Robert, E., Lance, E., & Amzil, Z. (2020). Cyanobacteria and cyanotoxins in estuarine water and sediment. *Aquatic Ecology*, 54(2), 625–640.
- Boscolo-Galazzo, F., Crichton, K. A., Barker, S., & Pearson, P. N. (2018). Temperature dependency of metabolic rates in the upper ocean : A positive feedback to global climate change? *Global and Planetary Change*, 170, 201–212.
- Bouman, H., Platt, T., Sathyendranath, S., & Stuart, V. (2005). Dependence of light-saturated photosynthesis on temperature and community structure. *Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers*, 52(7), 1284–1299.
- Bourdaud, P., Ben Rais Lasram, F., Araignous, E., Champagnat, J., Grusd, S., Halouani, G., Hattab, T., Leroy, B., Noguès, Q., Raoux, A., Safi, G., & Niquil, N. (2021). Impacts of climate change on the Bay of Seine ecosystem : Forcing a spatio-temporal trophic model with predictions from an ecological niche model. *Fisheries Oceanography*, 30(5), 471–489.
- Bowes, M. J., Loewenthal, M., Read, D. S., Hutchins, M. G., Prudhomme, C., Armstrong, L. K., Harman, S. A., Wickham, H. D., Gozzard, E., & Carvalho, L. (2016). Identifying multiple stressor controls on phytoplankton dynamics in the River Thames (UK) using high-frequency water quality data. *Science of The Total Environment*, 569-570, 1489–1499.
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., Telszewski, M., Yasuhara, M., & Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371).
- Brothers, S., Köhler, J., Attermeyer, K., Grossart, H. P., Mehner, T., Meyer, N., Scharnweber, K., & Hilt, S. (2014). A feedback loop links brownification and anoxia in a temperate, shallow lake. *Limnology and Oceanography*, 59(4), 1388–1398.
- Brown, A. R., Lilley, M., Shutler, J., Lowe, C., Artioli, Y., Torres, R., Berdalet, E., & Tyler, C. R. (2020). Assessing risks and mitigating impacts of harmful algal blooms on mariculture and marine fisheries. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1663–1688.
- Brzezinski, M. A. (1985). The Si :C :N ratio of marine diatoms : interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*, 21(3), 347–357.
- Burkholder, J. M., Glibert, P. M., & Skelton, H. M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, 8(1), 77–93.
- Burns, W. G., Marchetti, A., & Ziervogel, K. (2019). Enhanced formation of transparent exopolymer particles (TEP) under turbulence during phytoplankton growth. *Journal of Plankton Research*, 41(3), 349–361.

- Burson, A., Stomp, M., Akil, L., Brussaard, C. P. D., & Huisman, J. (2016). Unbalanced reduction of nutrient loads has created an offshore gradient from phosphorus to nitrogen limitation in the North Sea. *Limnology and Oceanography*, 61(3), 869–888.
- Burson, A., Stomp, M., Greenwell, E., Grosse, J., & Huisman, J. (2018). Competition for nutrients and light : testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. *Ecology*, 99(5), 1108–1118.
- Byun, D.-S., Wang, X. H., Hart, D. E., & Cho, Y.-K. (2005). Modeling the effect of freshwater inflows on the development of spring blooms in an estuarine embayment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65(1), 351–360.
- Cabrerizo, M. J., Carrillo, P., Villafañe, V. E., & Walter Helbling, E. (2014). Current and predicted global change impacts of UVR, temperature and nutrient inputs on photosynthesis and respiration of key marine phytoplankton groups. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 371–380.
- Cael, B. B. & Strong, C. (2018). A Laplacian characterization of phytoplankton shape. *Journal of Mathematical Biology*, 76(6), 1327–1338.
- Callieri, C., Sathicq, M. B., Cabello-Yeves, P. J., Eckert, E. M., & Hernández-Avilés, J. S. (2019). TEP production under oxidative stress of the picocyanobacterium *Synechococcus* : *Synechococcus* TEP production. *Journal of Limnology*, 78(3). Number : 3.
- Calvo-Díaz, A., Díaz-Pérez, L., Suárez, L. , Morán, X. A. G., Teira, E., & Marañón, E. (2011). Decrease in the Autotrophic-to-Heterotrophic Biomass Ratio of Picoplankton in Oligotrophic Marine Waters Due to Bottle Enclosure. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5739–5746.
- Camargo, E. C., Rossi, R. A., Silva, J. C., Miwa, A. C. P., Prášil, O., do Carmo Calijuri, M., & Lombardi, A. T. (2022). Comparing pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry with radiocarbon technique for determination of inorganic carbon fixation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 57(1), 18–28.
- Cao, X., Song, C., & Zhou, Y. (2010). Limitations of using extracellular alkaline phosphatase activities as a general indicator for describing P deficiency of phytoplankton in Chinese shallow lakes. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 33–41.
- Carnicer, J., Sardans, J., Stefanescu, C., Ubach, A., Bartrons, M., Asensio, D., & Peñuelas, J. (2015). Global biodiversity, stoichiometry and ecosystem function responses to human-induced C–N–P imbalances. *Journal of Plant Physiology*, 172, 82–91.
- Carpenter, S. R. (2008). Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11039–11040.

- Carpentier, A., Coppin, F., Curet, L., Dauvin, J.-C., Delavenne, J., Dewarumez, J.-M., Dupuis, L., Foveau, A., Garcia, C., Gardel, L., Harrop, S., Just, R., Koubbi, P., Lauria, V., Martin, C., Meaden, G., Morin, J., Ota, Y., Rostiaux, E., Smith, B., Spilmont, N., Vaz, S., Villanueva, C.-M., Verin, Y., Walton, J., & Warembourg, C. (2009). Atlas des Habitats des Ressources Marines de la Manche Orientale - CHARM II, Channel Habitat Atlas for marine Resource Management - CHARM II.
- Catherine, A., Troussellier, M., & Bernard, C. (2008). Design and application of a stratified sampling strategy to study the regional distribution of cyanobacteria (Ile-de-France, France). *Water Research*, 42(20), 4989–5001.
- Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E.-S., Mark, H., Aurélie, V., & Jean-François, H. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management. *Water Research*, 47(15), 5464–5479.
- Chai, Z. Y., Wang, H., Deng, Y., Hu, Z., & Zhong Tang, Y. (2020). Harmful algal blooms significantly reduce the resource use efficiency in a coastal plankton community. *Science of The Total Environment*, 704, 135381.
- Chan, T. U. & Hamilton, D. P. (2001). Effect of freshwater flow on the succession and biomass of phytoplankton in a seasonal estuary. *Marine and Freshwater Research*, 52(6), 869–884.
- Chen, C.-T. A. & Borges, A. V. (2009). Reconciling opposing views on carbon cycling in the coastal ocean : Continental shelves as sinks and near-shore ecosystems as sources of atmospheric CO₂. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 56(8), 578–590.
- Chen, J., Guo, K., Thornton, D. C. O., & Wu, Y. (2021). Effect of Temperature on the Release of Transparent Exopolymer Particles (TEP) and Aggregation by Marine Diatoms (*Thalassiosira weissflogii* and *Skeletonema marinoi*). *Journal of Ocean University of China*, 20(1), 56–66.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z.-L., Neilan, B. A., & Scheer, H. (2010). A Red-Shifted Chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318–1319.
- Chorus, I. & Spijkerman, E. (2020). What Colin Reynolds could tell us about nutrient limitation, N :P ratios and eutrophication control. *Hydrobiologia*. WOS :000562657300002.
- Chowdhury, M., Hardikar, R., Kesavan, H. C., Thomas, J., Mitra, A., Rokade, M. A., Naidu, V. S., & Sukumaran, S. (2017). Nutrient stoichiometry and freshwater flow in shaping of phytoplankton population in a tropical monsoonal estuary (Kundalika Estuary). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 198, 73–91.
- Chu, T. V., Torréton, J.-P., Mari, X., Nguyen, H. M. T., Pham, K. T., Pham, T. T., Bouvier, T., Bettarel, Y., Pringault, O., Bouvier, C., & Rochelle-Newall, E. (2014).

- Nutrient ratios and the complex structure of phytoplankton communities in a highly turbid estuary of Southeast Asia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(12), 8555–8572.
- Cipullo, N. (2016). Biodiversity Indicators : The Accounting Point of View. *Procedia Economics and Finance*, 39, 539–544.
- Claquin, P., Jacqueline, F., Repecaud, M., & Riou, P. (2018). MAREL SMILE buoy data and metadata from coriolis Data Centre. Type : dataset.
- 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). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86(1), 93–101.
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., & Veron, B. (2008). Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology*, 51(1), 1–11.
- Clark, R. (1971). Futility of phosphate detergent Ban. *Marine Pollution Bulletin*, 2(4), 50–51.
- Cloern, J. E., Foster, S. Q., & Kleckner, A. E. (2014). Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences*, 11(9), 2477–2501.
- Cocquempot, L., Delacourt, C., Paillet, J., Riou, P., Aucan, J., Castelle, B., Charria, G., Claudet, J., Conan, P., Coppola, L., Hocdé, R., Planes, S., Raimbault, P., Savoye, N., Testut, L., & Vuillemin, R. (2019). Coastal Ocean and Nearshore Observation : A French Case Study. *Frontiers in Marine Science*, 6, 324.
- Conley, D. J., Kilham, S. S., & Theriot, E. (1989). Differences in silica content between marine and freshwater diatoms. *Limnology and Oceanography*, 34(1), 205–212.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., & Likens, G. E. (2009). Controlling Eutrophication : Nitrogen and Phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014–1015.
- Corzo, A., Morillo, J. A., & Rodríguez, S. (2000). Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquatic Microbial Ecology*, 23(1), 63–72.
- Cotner, J. B. (2017). Nitrogen is Not a ‘House of Cards’. *Environmental Science & Technology*, 51(1), 3–3.
- Crutzen, P. J. (2006). The “Anthropocene”. In E. Ehlers & T. Krafft (Eds.), *Earth System Science in the Anthropocene* (pp. 13–18). Berlin, Heidelberg : Springer.

- Cáceres, C., Spatharis, S., Kaiserli, E., Smeti, E., Flowers, H., & Bonachela, J. A. (2019). Temporal phosphate gradients reveal diverse acclimation responses in phytoplankton phosphate uptake. *The ISME Journal*, 13(11), 2834–2845.
- da Silva, M. N., Granzotti, R. V., Bortolini, J. C., de Carvalho, P., Rodrigues, L. C., & Bini, L. M. (2021). Functional distance does not predict interspecific synchrony, but functional diversity directly affects community stability. *Limnologica*, 86, 125848.
- Daniell, K. A., Plant, R., Pilbeam, V., Sabinot, C., Paget, N., Astles, K., Steffens, R., Barreteau, O., Bouard, S., Coad, P., Gordon, A., Ferrand, N., Le Meur, P.-Y., Lejars, C., Maurel, P., Rubio, A., Rougier, J.-E., & White, I. (2020). Evolutions in estuary governance? Reflections and lessons from Australia, France and New Caledonia. *Marine Policy*, 112, 103704.
- Danovaro, R., Carugati, L., Berzano, M., Cahill, A. E., Carvalho, S., Chenuil, A., Corinaldesi, C., Cristina, S., David, R., Dell’Anno, A., Dzhenbekova, N., Garcés, E., Gasol, J. M., Goela, P., Féral, J.-P., Ferrera, I., Forster, R. M., Kurekin, A. A., Rastelli, E., Marinova, V., Miller, P. I., Moncheva, S., Newton, A., Pearman, J. K., Pitois, S. G., Reñé, A., Rodríguez-Ezpeleta, N., Saggiomo, V., Simis, S. G. H., Stefanova, K., Wilson, C., Lo Martire, M., Greco, S., Cochrane, S. K. J., Mangoni, O., & Borja, A. (2016). Implementing and Innovating Marine Monitoring Approaches for Assessing Marine Environmental Status. *Frontiers in Marine Science*, 3.
- Dauvin, J.-C. (2012). Are the eastern and western basins of the English Channel two separate ecosystems? *Marine Pollution Bulletin*, 64(3), 463–471.
- Dauvin, J.-C. (2019). Chapter 6 - The English Channel : La Manche. In C. Sheppard (Ed.), *World Seas : an Environmental Evaluation (Second Edition)* (pp. 153–188). Academic Press.
- Davidson, E. A. & Howarth, R. W. (2007). Nutrients in synergy. *Nature*, 449(7165), 1000–1001.
- Davidson, K., Gowen, R. J., Tett, P., Bresnan, E., Harrison, P. J., McKinney, A., Milligan, S., Mills, D. K., Silke, J., & Crooks, A.-M. (2012). Harmful algal blooms : How strong is the evidence that nutrient ratios and forms influence their occurrence? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 399–413.
- DelSontro, T., Beaulieu, J. J., & Downing, J. A. (2018). Greenhouse gas emissions from lakes and impoundments : Upscaling in the face of global change. *Limnology and Oceanography Letters*, 3(3), 64–75.
- Demers, S. (2011). *Particle Analysis in Oceanography*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, softcover reprint of the original 1st ed. 1991 édition edition.

- Deng, W., Cruz, B. N., & Neuer, S. (2016). Effects of nutrient limitation on cell growth, TEP production and aggregate formation of marine *Synechococcus*. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(1), 39–49.
- Diaz, R. J. & Rosenberg, R. (2008). Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science*, 321(5891), 926–929.
- Diaz-de Quijano, D., Stratmann, C. N., & Berger, S. A. (2020). DIY enzyme labelled fluorescence alcohol (ELFA) standard production protocol to quantify single-cell phosphatase activity (SCPA) of microplankton. *Heliyon*, 6(11), e05582.
- Dickey, T. D. (2003). Emerging ocean observations for interdisciplinary data assimilation systems. *Journal of Marine Systems*, 40-41, 5–48.
- Dijkman, N. A. & Kromkamp, J. C. (2006). Photosynthetic characteristics of the phytoplankton in the Scheldt estuary : community and single-cell fluorescence measurements. *European Journal of Phycology*, 41(4), 425–434.
- Dokulil, M. T. (2014). Photoautotrophic Productivity in Eutrophic Ecosystems. In A. A. Ansari & S. S. Gill (Eds.), *Eutrophication : Causes, Consequences and Control : Volume 2* (pp. 99–109). Dordrecht : Springer Netherlands.
- Domingues, R. B., Barbosa, A., & Galvão, H. (2005). Nutrients, light and phytoplankton succession in a temperate estuary (the Guadiana, south-western Iberia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(2), 249–260.
- D'ors, A., Bartolomé, M. C., & Sánchez-Fortún, S. (2016). Repercussions of salinity changes and osmotic stress in marine phytoplankton species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 175, 169–175.
- Druart, J. C. & Briand, J.-F. (2002). First record of *cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju (Cyanobacteria) in a lotic system in France. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 38(4), 339–342. Publisher : EDP Sciences.
- Dubinsky, Z. & Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton : mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 163–176.
- Ducharne, A. (2008). Importance of stream temperature to climate change impact on water quality. *Hydrology and Earth System Sciences*, 12(3), 797–810.
- Dugdale, R., Wilkerson, F., Parker, A. E., Marchi, A., & Taberski, K. (2012). River flow and ammonium discharge determine spring phytoplankton blooms in an urbanized estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 187–199.

- Dugenne, M., Thyssen, M., Nerini, D., Mante, C., Poggiale, J.-C., Garcia, N., Garcia, F., & Grégori, G. J. (2014). Consequence of a sudden wind event on the dynamics of a coastal phytoplankton community : an insight into specific population growth rates using a single cell high frequency approach. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Dunker, S. (2019). Hidden Secrets Behind Dots : Improved Phytoplankton Taxonomic Resolution Using High-Throughput Imaging Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 95A(8), 854–868.
- Dunker, S. (2020). Imaging Flow Cytometry for Phylogenetic and MorphologicallyBased Functional Group Clustering of a Natural Phytoplankton Community over 1 Year in an Urban Pond. *Cytometry Part A*, 97(7), 727–736.
- Dutz, J., Klein Breteler, W. C. M., & Kramer, G. (2005). Inhibition of copepod feeding by exudates and transparent exopolymer particles (TEP) derived from a *Phaeocystis globosa* dominated phytoplankton community. *Harmful Algae*, 4(5), 929–940.
- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2016). Phytoplankton growth and the interaction of light and temperature : A synthesis at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 61(4), 1232–1244. _eprint : <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/lno.10282>.
- Elbrächter, M. & Schnepf, E. (1996). *Gymnodinium chlorophorum*, a new, green, bloom-forming dinoflagellate (Gymnodiniales, Dinophyceae) with a vestigial prasinophyte endosymbiont. *Phycologia*, 35(5), 381–393.
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., & Smith, J. E. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10(12), 1135–1142.
- Elser, J. J. & Kimmel, B. L. (1986). Alteration of phytoplankton phosphorus status during enrichment experiments : implications for interpreting nutrient enrichment bioassay results. *Hydrobiologia*, 133(3), 217–222.
- Emmery, A., Alunno-Bruscia, M., Bataille, M. P., Kooijman, S. a. L. M., & Lefebvre, S. (2017). Dynamics of stable isotope ratios (¹³C and ¹⁵N) in different organs of *Crassostrea gigas* at two contrasted ecosystems : insights from growth and food sources. *Vie et Milieu / Life & Environment*, 66(3-4), 261–273.
- Engel, A. (2000). The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particle stickiness () during the decline of a diatom bloom. *Journal of Plankton Research*, 22(3), 485–497.
- Engel, A., Borchard, C., Loginova, A. N., Meyer, J., Hauss, H., & Kiko, R. (2015). Effects of varied nitrate and phosphate supply on polysaccharidic and proteinaceous gel

- particles production during tropical phytoplankton bloom experiments. *Biogeosciences (BG)*, 12, 5647–5665.
- Engel, A., Endres, S., Galgani, L., & Schartau, M. (2020). Marvelous Marine Microgels : On the Distribution and Impact of Gel-Like Particles in the Oceanic Water-Column. *Frontiers in Marine Science*, 7.
- Even, S., Thouvenin, B., Bacq, N., Billen, G., Garnier, J., Guezennec, L., Blanc, S., Ficht, A., & Le Hir, P. (2007). An integrated modelling approach to forecast the impact of human pressure in the Seine estuary. *Hydrobiologia*, 588(1), 13–29.
- Falkowski, P. (2000). Rationalizing elemental ratios in unicellular algae.
- Falkowski, P. G. (1984). Physiological responses of phytoplankton to natural light regimes *. *Journal of Plankton Research*, 6(2), 295–307.
- Falkowski, P. G. & LaRoche, J. (1991). Acclimation to Spectral Irradiance in Algae. *Journal of Phycology*, 27(1), 8–14.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (1998). Review of Aquatic Photosynthesis. *The New Phytologist*, 140(3), 597–598.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (2007). *Aquatic photosynthesis*. Princeton : Princeton University Press, 2nd ed edition.
- Fenchel, T., Blackburn, H., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012). *Bacterial Biogeochemistry : The Ecophysiology of Mineral Cycling*. Academic Press.
- Ferreira, A., Ciotti, M., Mendes, C. R. B., Uitz, J., & Bricaud, A. (2017). Phytoplankton light absorption and the package effect in relation to photosynthetic and photoprotective pigments in the northern tip of Antarctic Peninsula. *Journal of Geophysical Research : Oceans*, 122(9), 7344–7363.
- Filiz, N., Işkın, U., Beklioğlu, M., Öglü, B., Cao, Y., Davidson, T. A., Søndergaard, M., Lauridsen, T. L., & Jeppesen, E. (2020). Phytoplankton Community Response to Nutrients, Temperatures, and a Heat Wave in Shallow Lakes : An Experimental Approach. *Water*, 12(12), 3394.
- Filstrup, C. T., Hillebrand, H., Heathcote, A. J., Harpole, W. S., & Downing, J. A. (2014). Cyanobacteria dominance influences resource use efficiency and community turnover in phytoplankton and zooplankton communities. *Ecology Letters*, 17(4), 464–474.
- Filstrup, C. T., King, K. B. S., & McCullough, I. M. (2019). Evenness effects mask richness effects on ecosystem functioning at macro-scales in lakes. *Ecology Letters*, 22(12), 2120–2129.

- 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. *Journal of Plankton Research*, 32(1), 119–137.
- Finkel, Z. V., Irwin, A. J., & Schofield, O. (2004). Resource limitation alters the 3/4 size scaling of metabolic rates in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 273, 269–279.
- Fischer, A. D., Hayashi, K., McGaraghan, A., & Kudela, R. M. (2020). Return of the “age of dinoflagellates” in Monterey Bay : Drivers of dinoflagellate dominance examined using automated imaging flow cytometry and long-term time series analysis. *Limnology and Oceanography*, 65(9), 2125–2141.
- Fischer, R., Giebel, H.-A., & Ptacnik, R. (2017). Identity of the limiting nutrient (N vs. P) affects the competitive success of mixotrophs. *Marine Ecology Progress Series*, 563, 51–63.
- Fisher, T. R., Peele, E. R., Ammerman, J. W., & Harding, L. W. (1992). Nutrient limitation of phytoplankton in Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 82(1), 51–63.
- Fitzsimons, M. F., Probert, I., Gaillard, F., & Rees, A. P. (2020). Dissolved organic phosphorus uptake by marine phytoplankton is enhanced by the presence of dissolved organic nitrogen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 530–531, 151434.
- Flipo, N., Gallois, N., Labarthe, B., Baratelli, F., Viennot, P., Schuite, J., Rivière, A., Bonnet, R., & Boé, J. (2021). Pluri-annual Water Budget on the Seine Basin : Past, Current and Future Trends. In N. Flipo, P. Labadie, & L. Lestel (Eds.), *The Seine River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry* (pp. 59–89). Cham : Springer International Publishing.
- Flynn, D. F. B., Mirotchnick, N., Jain, M., Palmer, M. I., & Naeem, S. (2011). Functional and phylogenetic diversity as predictors of biodiversity–ecosystem-function relationships. *Ecology*, 92(8), 1573–1581.
- Font-Muñoz, J. S., Jordi, A., Anglès, S., Ferriol, P., Garcés, E., & Basterretxea, G. (2018). Assessing phytoplankton community composition using combined pigment and particle size distribution analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 594, 51–63.
- Fraga, F. (2001). Phytoplanktonic biomass synthesis : application to deviations from Redfield stoichiometry. *Scientia Marina*, 65(S2), 153–169.
- Frank, F., Danger, M., Hillebrand, H., & Striebel, M. (2020). Stoichiometric constraints on phytoplankton resource use efficiency in monocultures and mixtures. *Limnology and Oceanography*, 65(8), 1734–1746.

- Fresán, U., Marrin, D. L., Mejia, M. A., & Sabaté, J. (2019). Water Footprint of Meat Analogs : Selected Indicators According to Life Cycle Assessment. *Water*, 11(4), 728. Number : 4 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Fritsch, M., Morizur, Y., Lambert, E., Bonhomme, F., & Guinand, B. (2007). Assessment of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) stock delimitation in the Bay of Biscay and the English Channel based on mark-recapture and genetic data. *Fisheries Research*, 83(2), 123–132.
- Frost, P. C., Evans-White, M. A., Finkel, Z. V., Jensen, T. C., & Matzek, V. (2005). Are you what you eat ? Physiological constraints on organismal stoichiometry in an elementally imbalanced world. *Oikos*, 109(1), 18–28.
- Fuentes, S., Wikfors, G. H., & Meseck, S. (2014). Silicon Deficiency Induces Alkaline Phosphatase Enzyme Activity in Cultures of Four Marine Diatoms. *Estuaries and Coasts*, 37(2), 312–324.
- Fujiki, T. & Taguchi, S. (2002). Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance. *Journal of Plankton Research*, 24(9), 859–874.
- Fulweiler, R. W., Rabalais, N. N., & Heiskanen, A. S. (2012). The eutrophication commandments. *Marine Pollution Bulletin*, 64(10), 1997–1999.
- Gardner-Dale, D. A., Bradley, I. M., & Guest, J. S. (2017). Influence of solids residence time and carbon storage on nitrogen and phosphorus recovery by microalgae across diel cycles. *Water Research*, 121, 231–239.
- Garnier, J. & Billen, G. (2007). Production vs. Respiration in river systems : An indicator of an “ecological status”. *Science of The Total Environment*, 375(1), 110–124.
- Garnier, J., Billen, G., & Coste, M. (1995). Seasonal succession of diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the Seine River : Observation and modeling. *Limnology and Oceanography*, 40(4), 750–765.
- Garnier, J., Billen, G., & Cébron, A. (2007). Modelling nitrogen transformations in the lower Seine river and estuary (France) : impact of wastewater release on oxygenation and N₂O emission. *Hydrobiologia*, 588(1), 291–302.
- Garnier, J., Ramarson, A., Thieu, V., Némery, J., Théry, S., Billen, G., & Coynel, A. (2018). How can water quality be improved when the urban waste water directive has been fulfilled ? A case study of the Lot river (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(12), 11924–11939.
- Garnier, J., Riou, P., Le Gendre, R., Ramarson, A., Billen, G., Cugier, P., Schapira, M., Théry, S., Thieu, V., & Ménesguen, A. (2019). Managing the Agri-Food System of

- Watersheds to Combat Coastal Eutrophication : A Land-to-Sea Modelling Approach to the French Coastal English Channel. *Geosciences*, 9(10), 441.
- Garrett, R. H. & Grisham, C. M. (2016). *Biochemistry*. Boston, MA : Cengage Learning, 6th edition edition.
- Geider, R. & La Roche, J. (2002). Redfield revisited : variability of C :N :P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1–17.
- Genty, B., Briantais, J.-M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 87–92.
- Gerhard, M., Schlenker, A., Hillebrand, H., & Striebel, M. (2022). Environmental stoichiometry mediates phytoplankton diversity effects on communities' resource use efficiency and biomass. *Journal of Ecology*, 110(2), 430–442.
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., & Pröschold, T. (2005). Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell & Environment*, 28(10), 1218–1229.
- Gieskes, W. W. C., Kraay, G. W., & Baars, M. A. (1979). Current ^{14}C methods for measuring primary production : Gross underestimates in oceanic waters. *Netherlands Journal of Sea Research*, 13(1), 58–78.
- Glibert, P. M. (2016). Margalef revisited : A new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions, including nutritional physiology. *Harmful Algae*, 55, 25–30.
- Glibert, P. M. (2017). Eutrophication, harmful algae and biodiversity — Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 591–606.
- Glibert, P. M. & Burkholder, J. M. (2011). Harmful algal blooms and eutrophication : “strategies” for nutrient uptake and growth outside the Redfield comfort zone. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4), 724–738.
- Glibert, P. M., Burkholder, J. M., & Kana, T. M. (2012). Recent insights about relationships between nutrient availability, forms, and stoichiometry, and the distribution, ecophysiology, and food web effects of pelagic and benthic *Prorocentrum* species. *Harmful Algae*, 14, 231–259.
- Glibert, P. M., Maranger, R., Sobota, D. J., & Bouwman, L. (2014). The Haber Bosch–harmful algal bloom (HB–HAB) link. *Environmental Research Letters*, 9(10), 105001.

- Glibert, P. M., Middelburg, J. J., McClelland, J. W., & Jake Vander Zanden, M. (2019). Stable isotope tracers : Enriching our perspectives and questions on sources, fates, rates, and pathways of major elements in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 64(3), 950–981.
- Gobler, C. J., Burkholder, J. M., Davis, T. W., Harke, M. J., Johengen, T., Stow, C. A., & Van de Waal, D. B. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 87–97.
- Gohin, F., Van der Zande, D., Tilstone, G., Eleveld, M. A., Lefebvre, A., Andrieux-Loyer, F., Blauw, A. N., Bryère, P., Devreker, D., Garnesson, P., Hernández Fariñas, T., Lamaury, Y., Lampert, L., Lavigne, H., Menet-Nedelec, F., Pardo, S., & Saulquin, B. (2019). Twenty years of satellite and in situ observations of surface chlorophyll-a from the northern Bay of Biscay to the eastern English Channel. Is the water quality improving? *Remote Sensing of Environment*, 233, 111343.
- Gonzalez, A., Germain, R. M., Srivastava, D. S., Filotas, E., Dee, L. E., Gravel, D., Thompson, P. L., Isbell, F., Wang, S., Kéfi, S., Montoya, J., Zelnik, Y. R., & Loreau, M. (2020). Scaling-up biodiversity-ecosystem functioning research. *Ecology Letters*, 23(4), 757–776.
- Goss, R. & Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*, 172, 13–32.
- Granéli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. (2008). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species : The role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8(1), 94–102.
- Grimaud, G. M., Mairet, F., Sciandra, A., & Bernard, O. (2017). Modeling the temperature effect on the specific growth rate of phytoplankton : a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(4), 625–645.
- Grossman, A. R., Mackey, K. R. M., & Bailey, S. (2010). A Perspective on Photosynthesis in the Oligotrophic Oceans : Hypotheses Concerning Alternate Routes of Electron Flow1. *Journal of Phycology*, 46(4), 629–634.
- Grover, J. P. & Wang, F.-B. (2014). Competition and allelopathy with resource storage : Two resources. *Journal of Theoretical Biology*, 351, 9–24.
- Gualda, E. J., Pereira, H., Martins, G. G., Gardner, R., & Moreno, N. (2017). Three-dimensional imaging flow cytometry through light-sheet fluorescence microscopy. *Cytometry Part A*, 91(2), 144–151.
- Guildford, S. J. & Hecky, R. E. (2000). Total nitrogen, total phosphorus, and nutrient limitation in lakes and oceans : Is there a common relationship? *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1213–1223.

- Guézennec, L., Lafite, R., Dupont, J.-P., Meyer, R., & Boust, D. (1999). Hydrodynamics of suspended particulate matter in the tidal freshwater zone of a macrotidal estuary (the Seine Estuary, France). *Estuaries*, 22(3), 717–727.
- Gülzow, N., Wahlen, Y., & Hillebrand, H. (2018). Metaecosystem Dynamics of Marine Phytoplankton Alters Resource Use Efficiency along Stoichiometric Gradients. *The American Naturalist*, 193(1), 35–50.
- Gülzow, N., Wahlen, Y., & Hillebrand, H. (2019). Metaecosystem Dynamics of Marine Phytoplankton Alters Resource Use Efficiency along Stoichiometric Gradients. *The American Naturalist*, 193(1), 35–50.
- Grcs, Z., Tamamitsu, M., Bianco, V., Wolf, P., Roy, S., Shindo, K., Yanny, K., Wu, Y., Koydemir, H. C., Rivenson, Y., & Ozcan, A. (2018). A deep learning-enabled portable imaging flow cytometer for cost-effective, high-throughput, and label-free analysis of natural water samples. *Light : Science & Applications*, 7(1), 66. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- Hall, S. R., Smith, V. H., Lytle, D. A., & Leibold, M. A. (2005). Constraints on Primary Producer N :P Stoichiometry Along N :P Supply Ratio Gradients. *Ecology*, 86(7), 1894–1904.
- Hama, T., Miyazaki, T., Ogawa, Y., Iwakuma, T., Takahashi, M., Otsuki, A., & Ichimura, S. (1983). Measurement of photosynthetic production of a marine phytoplankton population using a stable ^{13}C isotope. *Marine Biology*, 73(1), 31–36.
- Hamilton, A. J. (2005). Species diversity or biodiversity? *Journal of Environmental Management*, 75(1), 89–92.
- Hammes, F., Vital, M., & Egli, T. (2010). Critical Evaluation of the Volumetric “Bottle Effect” on Microbial Batch Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1278–1281. Publisher : American Society for Microbiology.
- Han, J., Chen, J., Miao, Y., & Wan, S. (2016). Multiple Resource Use Efficiency (m RUE) : A New Concept for Ecosystem Production. *Scientific Reports*, 6(1), 37453.
- Hannah, D. M., Abbott, B. W., Khamis, K., Kelleher, C., Lynch, I., Krause, S., & Ward, A. S. (2022). Illuminating the ‘invisible water crisis’ to address global water pollution challenges. *Hydrological Processes*, 36(3), e14525.
- Hansen, G., Botes, L., & Salas, M. D. (2007). Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycological Research*, 55(1), 25–41.
- Hao, Z., Gao, Y., & Yang, T. (2017). Seasonal variation of DOM and associated stoichiometry for freshwater ecosystem in the subtropical watershed : Indicating the optimal C : N : P ratio. *Ecological Indicators*, 78, 37–47.

- Harpole, W. S., Ngai, J. T., Cleland, E. E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Bracken, M. E. S., Elser, J. J., Gruner, D. S., Hillebrand, H., Shurin, J. B., & Smith, J. E. (2011). Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters*, 14(9), 852–862.
- Harrison, J. W. & Smith, R. E. H. (2013). Effects of nutrients and irradiance on PSII variable fluorescence of lake phytoplankton assemblages. *Aquatic Sciences*, 75(3), 399–411.
- Harrison, P. A., Berry, P. M., Simpson, G., Haslett, J. R., Blicharska, M., Bucur, M., Dunford, R., Egoh, B., Garcia-Llorente, M., Geamănă, N., Geertsema, W., Lommelen, E., Meiresonne, L., & Turkelboom, F. (2014). Linkages between biodiversity attributes and ecosystem services : A systematic review. *Ecosystem Services*, 9, 191–203.
- Harrison, P. J., Zingone, A., Mickelson, M. J., Lehtinen, S., Ramaiah, N., Kraberg, A. C., Sun, J., McQuatters-Gollop, A., & Jakobsen, H. H. (2015). Cell volumes of marine phytoplankton from globally distributed coastal data sets. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 162, 130–142.
- Hasler, A. D. (1947). Eutrophication of Lakes by Domestic Drainage. *Ecology*, 28(4), 383–395. Publisher : Ecological Society of America.
- Heil, C. A. & Muni-Morgan, A. L. (2021). Florida’s Harmful Algal Bloom (HAB) Problem : Escalating Risks to Human, Environmental and Economic Health With Climate Change. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 299.
- Hein, Pedersen, F, M., & Sand-Jensen (1995). Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 118, 247–253.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stoecker, D. K., & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms : A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13.
- Hernández-Fariñas, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., & Bacher, C. (2014). Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 71(4), 821–833.
- Hillebrand, H., Acevedo-Trejos, E., Moorthi, S. D., Ryabov, A., Striebel, M., Thomas, P. K., & Schneider, M.-L. (2022). Cell size as driver and sentinel of phytoplankton community structure and functioning. *Functional Ecology*, 36(2), 276–293.
- Hillebrand, H., Cowles, J. M., Lewandowska, A., Van de Waal, D. B., & Plum, C. (2014). Think ratio ! A stoichiometric view on biodiversity–ecosystem functioning research. *Basic and Applied Ecology*, 15(6), 465–474.

- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403–424.
- Hoagland, P. & Scatasta, S. (2006). The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In E. Granéli & J. T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies (pp. 391–402). Berlin, Heidelberg : Springer.
- Hodapp, D., Hillebrand, H., & Striebel, M. (2019). “Unifying” the Concept of Resource Use Efficiency in Ecology. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6.
- Honsell, G. & Talarico, L. (2004). *Gymnodinium chlorophorum* (Dinophyceae) in the Adriatic Sea : electron microscopical observations. *Botanica Marina*, 47(2), 152–166. Publisher : De Gruyter Section : Botanica Marina.
- Horton, P. & Ruban, A. (2005). Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna : photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 365–373.
- Horton, R. A., Moran, L. A., Scrimgeour, G., Perry, M., & Rawn, D. (2005). *Principles of Biochemistry : United States Edition*. Upper Saddle River, NJ : Pearson, 4e édition edition.
- Howarth, R. W. (2008). Coastal nitrogen pollution : A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae*, 8(1), 14–20.
- Howarth, R. W. & Marino, R. (2006). Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems : Evolving views over three decades. *Limnology and Oceanography*, 51(1part2), 364–376.
- Hrustic, E., Lignell, R., Riebesell, U., & Thingstad, T. F. (2017). Exploring the distance between nitrogen and phosphorus limitation in mesotrophic surface waters using a sensitive bioassay. *Biogeosciences*, 14(2), 379–387.
- Hughes, D. J. (2018). *Using next-generation multi-spectral FRRf to improve current estimates of marine primary production (MPP) within Australian waters*. Thesis.
- Hughes, D. J., Giannini, F. C., Ciotti, A. M., Doblin, M. A., Ralph, P. J., Varkey, D., Verma, A., & Suggett, D. J. (2021). Taxonomic Variability in the Electron Requirement for Carbon Fixation Across Marine Phytoplankton. *Journal of Phycology*, 57(1), 111–127.
- Hughes, D. J., Varkey, D., Doblin, M. A., Ingleton, T., Mcinnes, A., Ralph, P. J., van Dongen-Vogels, V., & Suggett, D. J. (2018). Impact of nitrogen availability upon the electron requirement for carbon fixation in Australian coastal phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography*, 63(5), 1891–1910.

- Huisman, J. & Weissing, F. J. (1994). Light-Limited Growth and Competition for Light in Well-Mixed Aquatic Environments : An Elementary Model. *Ecology*, 75(2), 507–520.
- Hulot, F. D., Lacroix, G., Lescher-Moutoué, F., & Loreau, M. (2000). Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature*, 405(6784), 340–344.
- Huo, S., Li, X., Xi, B., Zhang, H., Ma, C., & He, Z. (2020). Combining morphological and metabarcoding approaches reveals the freshwater eukaryotic phytoplankton community. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 37.
- Huot, Y. & Babin, M. (2010). Overview of Fluorescence Protocols : Theory, Basic Concepts, and Practice. In D. J. Suggett, O. Prášil, & M. A. Borowitzka (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences : Methods and Applications*, Developments in Applied Phycology (pp. 31–74). Dordrecht : Springer Netherlands.
- Håkanson, L. & Bryhn, A. (2010). Controlling Eutrophication in the Baltic Sea and the Kattegat. In *Eutrophication : Causes, Consequences and Control* (pp. 17–67). Journal Abbreviation : Eutrophication : Causes, Consequences and Control.
- Ibáñez, C. & Peñuelas, J. (2019). Changing nutrients, changing rivers. *Science*.
- Iriarte, J. L., León-Muñoz, J., Marcé, R., Clément, A., & Lara, C. (2017). Influence of seasonal freshwater streamflow regimes on phytoplankton blooms in a Patagonian fjord. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 51(2), 304–315.
- Isles, P. D. F. (2020). The misuse of ratios in ecological stoichiometry. *Ecology*, 101(11), e03153.
- Jacquet, S., Delesalle, B., Torréton, J.-P., & Blanchot, J. (2006). Response of phytoplankton communities to increased anthropogenic influences (southwestern lagoon, New Caledonia). *Marine Ecology Progress Series*, 320, 65–78.
- Jeffrey, S. W., Wright, S. W., & Zapata, M. (1999). Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, 50(8), 879–896.
- Jiang, Z., Du, P., Liu, J., Chen, Y., Zhu, Y., Shou, L., Zeng, J., & Chen, J. (2019). Phytoplankton biomass and size structure in Xiangshan Bay, China : Current state and historical comparison under accelerated eutrophication and warming. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 119–128.
- Karasiewicz, S., Chapelle, A., Bacher, C., & Soudant, D. (2020). Harmful algae niche responses to environmental and community variation along the French coast. *Harmful Algae*, 93, 101785.
- Kassambara, A. (2017). *Practical Guide To Principal Component Methods in R : PCA, M(CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra*. STHDA.

- Kautsky, H. & Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, 19(48), 964–964.
- Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 365(1541), 729–748. Publisher : Royal Society.
- Ketchum, B. (1954). Mineral Nutrition of Phytoplankton. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 5, 55–74.
- Khalyfa, A., Kermasha, S., & Alli, I. (1992). Extraction, purification, and characterization of chlorophylls from spinach leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(2), 215–220.
- Kim, S.-Y., Roh, Y. H., Shin, H. H., Huh, S., Kang, S.-H., & Lim, D. (2018). Decadal-scale variations of sedimentary dinoflagellate cyst records from the Yellow Sea over the last 400 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 200, 91–98.
- Kimance, S. A., Allen, M. J., Pagarete, A., Martínez, J. M., & Wilson, W. H. (2014). Reduction in photosystem II efficiency during a virus-controlled *Emiliana huxleyi* bloom. *Marine Ecology Progress Series*, 495, 65–76.
- Kimmerer, W. J. & Thompson, J. K. (2014). Phytoplankton Growth Balanced by Clam and Zooplankton Grazing and Net Transport into the Low-Salinity Zone of the San Francisco Estuary. *Estuaries and Coasts*, 37(5), 1202–1218.
- Kirk, J. T. O. (1994). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge : Cambridge University Press, 2 edition.
- Kirk, J. T. O. (2010). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge, UK ; New York : Cambridge University Press, 3rd edition edition.
- Klais, R., Tamminen, T., Kremp, A., Spilling, K., An, B. W., Hajdu, S., & Olli, K. (2013). Spring phytoplankton communities shaped by interannual weather variability and dispersal limitation : Mechanisms of climate change effects on key coastal primary producers. *Limnology and Oceanography*, 58(2), 753–762.
- Klausmeier, C. A., Litchman, E., Daufresne, T., & Levin, S. A. (2004). Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 429(6988), 171–174.
- Klein, C., Claquin, P., Pannard, A., Napoléon, C., Roy, B. L., & Véron, B. (2011). Dynamics of soluble extracellular polymeric substances and transparent exopolymer particle pools in coastal ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 427, 13–27.
- Ko, E., Park, J., Gorbunov, M. Y., & Yoo, S. (2019). Uncertainties in variable fluorescence and ¹⁴C methods to estimate primary production : a case study in the coastal waters off the Korean peninsula. *Marine Ecology Progress Series*, 627, 13–31.

- Koch, R. W., Guelda, D. L., & Bukaveckas, P. A. (2004). Phytoplankton growth in the Ohio, Cumberland and Tennessee Rivers, USA : inter-site differences in light and nutrient limitation. *Aquatic Ecology*, 38(1), 17–26.
- Kocum, E., Nedwell, D. B., & Underwood, G. J. C. (2002a). Regulation of phytoplankton primary production along a hypernutrified estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 231, 13–22.
- Kocum, E., Underwood, G. J. C., & Nedwell, D. B. (2002b). Simultaneous measurement of phytoplanktonic primary production, nutrient and light availability along a turbid, eutrophic UK east coast estuary (the Colne Estuary). *Marine Ecology Progress Series*, 231, 1–12.
- Kolber, Z. & Falkowski, P. G. (1993). Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnology and Oceanography*, 38(8), 1646–1665.
- Kolber, Z., Zehr, J., & Falkowski, P. (1988). Effects of Growth Irradiance and Nitrogen Limitation on Photosynthetic Energy Conversion in Photosystem II 1. *Plant Physiology*, 88(3), 923–929.
- Krause, G. H. & Weis, E. (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis : The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 313–349.
- Kristiana, R., Antenucci, J. P., & Imberger, J. (2012). Using a Multi-Component Indicator Toward Reducing Phytoplankton Bloom Occurrences in the Swan River Estuary. *Environmental Management*, 50(2), 237–256.
- Kroeze, C., Hofstra, N., Ivens, W., Löhr, A., Stokal, M., & van Wijnen, J. (2013). The links between global carbon, water and nutrient cycles in an urbanizing world — the case of coastal eutrophication. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(6), 566–572.
- Kromkamp, J., Peene, J., van Rijswijk, P., Sandee, A., & Goosen, N. (1995). Nutrients, light and primary production by phytoplankton and microphytobenthos in the eutrophic, turbid Westerschelde estuary (The Netherlands). *Hydrobiologia*, 311(1), 9–19.
- Kromkamp, J. C. & Forster, R. M. (2003). The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems : differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology*, 38(2), 103–112.
- Krueger-Hadfield, S. A., Balestreri, C., Schroeder, J., Highfield, A., Helaouët, P., Allum, J., Moate, R., Lohbeck, K. T., Miller, P. I., Riebesell, U., Reusch, T. B. H., Rickaby, R. E. M., Young, J., Hallegraeff, G., Brownlee, C., & Schroeder, D. C. (2014). Genotyping an *Emiliania huxleyi* (prymnesiophyceae) bloom event in the North Sea reveals evidence of asexual reproduction. *Biogeosciences*, 11(18), 5215–5234.

- Kuenzler, E. J. & Perras, J. P. (1965). Phosphatases of marine algae. *The Biological Bulletin*, 128(2), 271–284.
- Kvaterniuk, S., Kvaterniuk, O., Petruk, V., Mandebura, A., Mandebura, S., Gradz, Z. M., Rakhmetullina, S., & Arshidinova, M. (2019). Multispectral environmental monitoring of phytoplankton pigment parameters in aquatic environments. In R. S. Romaniuk & M. Linczuk (Eds.), *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments 2019* (pp. 123). Wilga, Poland : SPIE.
- Labry, C., Delmas, D., & Herbland, A. (2005). Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(2), 213–225.
- Larkum, A. W. (2016). Photosynthesis and Light Harvesting in Algae. In M. A. Borowitzka, J. Beardall, & J. A. Raven (Eds.), *The Physiology of Microalgae*, Developments in Applied Phycology (pp. 67–87). Cham : Springer International Publishing.
- Laruelle, G. G., Dürr, H. H., Lauerwald, R., Hartmann, J., Slomp, C. P., Goossens, N., & Regnier, P. a. G. (2013). Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. *Hydrology and Earth System Sciences*, 17(5), 2029–2051. Publisher : Copernicus GmbH.
- Lavaud, J., Strzepek, R. F., & Kroth, P. G. (2007). Photoprotection capacity differs among diatoms : Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography*, 52(3), 1188–1194.
- Lawrenz, E., Silsbe, G., Capuzzo, E., Ylöstalo, P., Forster, R. M., Simis, S. G. H., Prášil, O., Kromkamp, J. C., Hickman, A. E., Moore, C. M., Forget, M.-H., Geider, R. J., & Suggett, D. J. (2013). Predicting the Electron Requirement for Carbon Fixation in Seas and Oceans. *PLOS ONE*, 8(3), e58137.
- Le Hir, P., Ficht, A., Jacinto, R. S., Lesueur, P., Dupont, J.-P., Lafite, R., Brenon, I., Thouvenin, B., & Cugier, P. (2001). Fine sediment transport and accumulations at the mouth of the Seine estuary (France). *Estuaries*, 24(6), 950–963.
- Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, A., & Pinay, G. (2019). Eutrophication : A new wine in an old bottle? *Science of The Total Environment*, 651, 1–11.
- Lean, C. H. (2017). Biodiversity Realism : Preserving the tree of life. *Biology & Philosophy*, 32(6), 1083–1103.
- Lee, J. H., Lee, W. C., Kim, H. C., Jo, N., Jang, H. K., Kang, J. J., Lee, D., Kim, K., & Lee, S. H. (2020). Transparent Exopolymer Particle (TEPs) Dynamics and Contribution to Particulate Organic Carbon (POC) in Jaran Bay, Korea. *Water*, 12(4), 1057.

- Lefebvre, S., Claquin, P., Orvain, F., Véron, B., & Charpy, L. (2012). Spatial and temporal dynamics of size-structured photosynthetic parameters (PAM) and primary production (^{13}C) of pico- and nano-phytoplankton in an atoll lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, 65(10), 478–489.
- Lefort, T. & Gasol, J. M. (2014). Short-time scale coupling of picoplankton community structure and single-cell heterotrophic activity in winter in coastal NW Mediterranean Sea waters. *Journal of Plankton Research*, 36(1), 243–258.
- Lefran, A., Fariñas, T. H., Gohin, F., & Claquin, P. (2021). Decadal trajectories of phytoplankton communities in contrasted estuarine systems in an epicontinental sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, (pp. 107409).
- Lehtinen, S., Tamminen, T., Ptacnik, R., & Andersen, T. (2017). Phytoplankton species richness, evenness, and production in relation to nutrient availability and imbalance. *Limnology and Oceanography*, 62(4), 1393–1408.
- Lemesle, S., Mussio, I., Rusig, A.-M., Menet-Nédélec, F., & Claquin, P. (2015). Impact of seaweed beachings on dynamics of ^{15}N isotopic signatures in marine macroalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1), 241–254.
- Leroux, R., Gregori, G., Leblanc, K., Carlotti, F., Thyssen, M., Dugenne, M., Pujo-Pay, M., Conan, P., Jouandet, M. P., Bhairy, N., & Berline, L. (2018). Combining laser diffraction, flow cytometry and optical microscopy to characterize a nanophytoplankton bloom in the Northwestern Mediterranean. *Progress in Oceanography*, 163, 248–259.
- Leruste, A., Pasqualini, V., Garrido, M., Malet, N., De Wit, R., & Bec, B. (2019). Physiological and behavioral responses of phytoplankton communities to nutrient availability in a disturbed Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219, 176–188.
- Letscher, R. T. & Moore, J. K. (2015). Preferential remineralization of dissolved organic phosphorus and non-Redfield DOM dynamics in the global ocean : Impacts on marine productivity, nitrogen fixation, and carbon export. *Global Biogeochemical Cycles*, 29(3), 325–340.
- Li, A., Stoecker, D. K., & Coats, D. W. (2000). Mixotrophy in gyrodinium galatheanum (Dinophyceae) : grazing responses to light intensity and inorganic nutrients*. *Journal of Phycology*, 36(1), 33–45.
- Li, B., Karl, D. M., Letelier, R. M., & Church, M. J. (2011). Size-dependent photosynthetic variability in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*, 440, 27–40.
- Li, H., Chen, Y., Zhou, S., Wang, F., Yang, T., Zhu, Y., & Ma, Q. (2021a). Change of dominant phytoplankton groups in the eutrophic coastal sea due to atmospheric deposition. *Science of The Total Environment*, 753, 141961.

- Li, J., Yin, W., Jia, H., & Xin, X. (2021b). Hydrological management strategies for the control of algal blooms in regulated lowland rivers. *Hydrological Processes*, 35(6), e14171.
- Li, S., Winters, H., Jeong, S., Emwas, A.-H., Vigneswaran, S., & Amy, G. L. (2016). Marine bacterial transparent exopolymer particles (TEP) and TEP precursors : Characterization and RO fouling potential. *Desalination*, 379, 68–74.
- Li, S., Winters, H., Villacorte, L. O., Ekowati, Y., Emwas, A.-H., Kennedy, M. D., & Amy, G. L. (2015). Compositional similarities and differences between transparent exopolymer particles (TEPs) from two marine bacteria and two marine algae : Significance to surface biofouling. *Marine Chemistry*, 174, 131–140.
- Li, W. K. W. (1997). Cytometric diversity in marine ultraphytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 42(5), 874–880.
- Li, X., Chai, X., Zheng, L., Deng, Q., Chen, X., Zhang, Q., Wan, L., Song, C., Song, L., Zhou, Y., & Cao, X. (2020a). Coupling between Benthic Nutrient Cycling and Pelagic Phytoplankton Community in Taiwan Strait in Spring 2018. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 807. Number : 10 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Li, X., Lu, C., Zhang, Y., Zhao, H., Wang, J., Liu, H., & Yin, K. (2020b). Low dissolved oxygen in the Pearl River estuary in summer : Long-term spatio-temporal patterns, trends, and regulating factors. *Marine Pollution Bulletin*, 151, 110814.
- Li, Z., Li, W., Zhang, Y., Hu, Y., Sheward, R., Irwin, A. J., & Finkel, Z. V. (2021c). Dynamic Photophysiological Stress Response of a Model Diatom to Ten Environmental Stresses. *Journal of Phycology*, 57(2), 484–495.
- Liang, Y., Zhang, G., Wan, A., Zhao, Z., Wang, S., & Liu, Q. (2019). Nutrient-limitation induced diatom-dinoflagellate shift of spring phytoplankton community in an offshore shellfish farming area. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 1–8.
- Lichtenthaler, H. (1992). The Kautsky effect : 60 years of chlorophyll fluorescence. *Photosynthetic*, 27(1-2), 45–55.
- Lie, A. A. Y., Wong, C. K., Lam, J. Y. C., Liu, J. H., & Yung, Y. K. (2011). Changes in the nutrient ratios and phytoplankton community after declines in nutrient concentrations in a semi-enclosed bay in Hong Kong. *Marine Environmental Research*, 71(3), 178–188.
- Lin, S., Litaker, R. W., & Sunda, W. G. (2016). Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 52(1), 10–36.
- Lin, X., Wang, L., Shi, X., & Lin, S. (2015). Rapidly diverging evolution of an atypical alkaline phosphatase (PhoAaty) in marine phytoplankton : insights from dinoflagellate alkaline phosphatases. *Frontiers in Microbiology*, 6.

- Lin, X., Zhang, H., Huang, B., & Lin, S. (2011). Alkaline Phosphatase Gene Sequence And Transcriptional Regulation By Phosphate Limitation In Amphidinium Carterae (Dinophyceae)1. *Journal of Phycology*, 47(5), 1110–1120.
- Lin, X., Zhang, H., Huang, B., & Lin, S. (2012). Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 17, 14–24.
- Lionard, M., Azémar, F., Boulêtreau, S., Muylaert, K., Tackx, M., & Vyverman, W. (2005). Grazing by meso- and microzooplankton on phytoplankton in the upper reaches of the Schelde estuary (Belgium/The Netherlands). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(4), 764–774.
- Lips, I. & Lips, U. (2008). Abiotic factors influencing cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Hydrobiologia*, 614(1), 133–140.
- Litchman, E. & Nguyen, B. L. V. (2008). Alkaline Phosphatase Activity as a Function of Internal Phosphorus Concentration in Freshwater Phytoplankton1. *Journal of Phycology*, 44(6), 1379–1383.
- Liu, B., de Swart, H. E., & de Jonge, V. N. (2018). Phytoplankton bloom dynamics in turbid, well-mixed estuaries : A model study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 211, 137–151.
- Lorey, D. E. (2003). *Global Environmental Challenges of the Twenty-first Century : Resources, Consumption, and Sustainable Solutions*. Rowman & Littlefield.
- Luz, B. & Barkan, E. (2000). Assessment of Oceanic Productivity with the Triple-Isotope Composition of Dissolved Oxygen. *Science*. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- Ly, J., Philippart, C. J. M., & Kromkamp, J. C. (2014). Phosphorus limitation during a phytoplankton spring bloom in the western Dutch Wadden Sea. *Journal of Sea Research*, 88, 109–120.
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR : An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18.
- López-Blanco, C., Tasevska, O., Kostoski, G., Wagner, B., & Wilke, T. (2020). Ancient civilizations already had an impact on cladoceran assemblages in Europe’s oldest lake. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 552, 109734.
- López-Sandoval, D. C., Rodríguez-Ramos, T., Cermeño, P., Sobrino, C., & Marañón, E. (2014). Photosynthesis and respiration in marine phytoplankton : Relationship with cell size, taxonomic affiliation, and growth phase. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 457, 151–159.

- Ma, J., Wang, P., Ren, L., Wang, X., & Paerl, H. W. (2019). Using alkaline phosphatase activity as a supplemental index to optimize predicting algal blooms in phosphorus-deficient lakes : A case study of Lake Taihu, China. *Ecological Indicators*, 103, 698–712.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., & Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of Photosynthesis Irradiance Response Curves and Photosynthetic Pigments in Microalgae and Cyanobacteria¹. *Journal of Phycology*, 38(1), 17–38.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M., & Geider, R. J. (2000). The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends in Plant Science*, 5(1), 12–17.
- MacKey, K. R. M., Rivlin, T., Grossman, A. R., Post, A. F., & Paytan, A. (2009). Pico-phytoplankton responses to changing nutrient and light regimes during a bloom. *Marine Biology*, 156(8), 1531–1546.
- Maier, G., Glegg, G. A., Tappin, A. D., & Worsfold, P. J. (2012). A high resolution temporal study of phytoplankton bloom dynamics in the eutrophic Taw Estuary (SW England). *Science of The Total Environment*, 434, 228–239.
- Majaneva, M., Autio, R., Huttunen, M., Kuosa, H., & Kuparinen, J. (2009). Phytoplankton monitoring : the effect of sampling methods used during different stratification and bloom conditions in the Baltic Sea. *Boreal Environment Research*, 14, 313–322.
- Makareviciute-Fichtner, K., Matthiessen, B., Lotze, H. K., & Sommer, U. (2021). Phytoplankton nutritional quality is altered by shifting Si :N ratios and selective grazing. *Journal of Plankton Research*, 43(3), 325–337.
- Malerba, M. E., Connolly, S. R., & Heimann, K. (2016). Standard flow cytometry as a rapid and non-destructive proxy for cell nitrogen quota. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1085–1095.
- Malerba, M. E., Marshall, D. J., Palacios, M. M., Raven, J. A., & Beardall, J. (2021). Cell size influences inorganic carbon acquisition in artificially selected phytoplankton. *New Phytologist*, 229(5), 2647–2659.
- Malerba, M. E., Palacios, M. M., & Marshall, D. J. (2018). Do larger individuals cope with resource fluctuations better ? An artificial selection approach. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 285(1884), 20181347.
- Malone, T. C. & Newton, A. (2020). The Globalization of Cultural Eutrophication in the Coastal Ocean : Causes and Consequences. *Frontiers in Marine Science*, 7, 670.
- Mangoni, O., Saggiomo, M., Modigh, M., Catalano, G., Zingone, A., & Saggiomo, V. (2009). The role of platelet ice microalgae in seeding phytoplankton blooms in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica) : a mesocosm experiment. *Polar Biology*, 32(3), 311–323.

- Mangoni, O., Saggiomo, V., Bolinesi, F., Margiotta, F., Budillon, G., Cotroneo, Y., Misic, C., Rivaro, P., & Saggiomo, M. (2017). Phytoplankton blooms during austral summer in the Ross Sea, Antarctica : Driving factors and trophic implications. *PLoS ONE*, 12(4).
- Mari, X., Beauvais, S., Lemée, R., & Pedrotti, M. L. (2001). Non-Redfield C :N ratio of transparent exopolymeric particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 46(7), 1831–1836.
- Mari, X., Rassoulzadegan, F., Brussaard, C. P. D., & Wassmann, P. (2005). Dynamics of transparent exopolymeric particles (TEP) production by *Phaeocystis globosa* under N- or P-limitation : a controlling factor of the retention/export balance. *Harmful Algae*, 4(5), 895–914.
- Martin, G. D., Vijay, J. G., Laluraj, C. M., Madhu, N. V., Joseph, T., Nair, M., Gupta, G. V. M., & Balachandran, K. K. (2008). Fresh water influence on nutrient stoichiometry in a tropical estuary, Southwest coast of India. *Applied Ecology and Environmental Research*.
- Marín Leal, J. C., Dubois, S., Orvain, F., Galois, R., Blin, J.-L., Ropert, M., Bataillé, M.-P., Ourry, A., & Lefebvre, S. (2008). Stable isotopes (^{13}C , ^{15}N) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Marine Biology*, 153(4), 673–688.
- Masuda, T., Prášil, O., Villafañe, V. E., Valiñas, M. S., Inomura, K., & Helbling, E. W. (2021). Impact of Increased Nutrients and Lowered pH on Photosynthesis and Growth of Three Marine Phytoplankton Communities From the Coastal South West Atlantic (Patagonia, Argentina). *Frontiers in Marine Science*, 8.
- Masó, M. & Garcés, E. (2006). Harmful microalgae blooms (HAB) ; problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*, 53(10), 620–630.
- Mather, R. L., Reynolds, S. E., Wolff, G. A., Williams, R. G., Torres-Valdes, S., Woodward, E. M. S., Landolfi, A., Pan, X., Sanders, R., & Achterberg, E. P. (2008). Phosphorus cycling in the North and South Atlantic Ocean subtropical gyres. *Nature Geoscience*, 1(7), 439–443.
- Matsubara, S., Schneider, T., & Maurino, V. G. (2016). Dissecting Long-Term Adjustments of Photoprotective and Photo-Oxidative Stress Acclimation Occurring in Dynamic Light Environments. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Mauzerall, D. (1976). Multiple excitations in photosynthetic systems. *Biophysical Journal*, 16(1), 87–91.
- Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668.

- Mayer, B. K., Baker, L. A., Boyer, T. H., Drechsel, P., Gifford, M., Hanjra, M. A., Parameswaran, P., Stoltzfus, J., Westerhoff, P., & Rittmann, B. E. (2016). Total Value of Phosphorus Recovery. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 6606–6620.
- Mayer, P. (2006). Biodiversity—The Appreciation of Different Thought Styles and Values Helps to Clarify the Term. *Restoration Ecology*, 14(1), 105–111.
- McFadden, G. I. (2001). Chloroplast Origin and Integration. *Plant Physiology*, 125(1), 50–53.
- McGrath, C. (2020). Highlight : The Colorful History of Plastids. *Genome Biology and Evolution*, 12(7), 991–992.
- Meerhoff, M., Audet, J., Davidson, T. A., De Meester, L., Hilt, S., Kosten, S., Liu, Z., Mazzeo, N., Paerl, H., Scheffer, M., & Jeppesen, E. (2022). Feedbacks between climate change and eutrophication : revisiting the allied attack concept and how to strike back. *Inland Waters*, 0(ja), 1–42.
- Meybeck, M., Lestel, L., Carré, C., Bouleau, G., Garnier, J., & Mouchel, J. M. (2018). Trajectories of river chemical quality issues over the Longue Durée : the Seine River (1900S–2010). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23468–23484.
- Minghui, H., Yiping, Y., Chunling, X., & Harrison, P. J. (1990). Phosphate limitation of phytoplankton growth in the Changjiang Estuary. *Acta Oceanologica Sinica*, (3), 405–411. Publisher : Acta Oceanologica Sinica.
- Minx, J. C., Lamb, W. F., Andrew, R. M., Canadell, J. G., Crippa, M., Döbbeling, N., Forster, P. M., Guizzardi, D., Olivier, J., Peters, G. P., Pongratz, J., Reisinger, A., Rigby, M., Saunio, M., Smith, S. J., Solazzo, E., & Tian, H. (2021). A comprehensive and synthetic dataset for global, regional, and national greenhouse gas emissions by sector 1970–2018 with an extension to 2019. *Earth System Science Data*, 13(11), 5213–5252.
- Mishra, A. K., Tiwari, D. N., & Rai, A. N. (2018). *Cyanobacteria : From Basic Science to Applications*. Academic Press.
- Moorhouse, H. L., Read, D. S., McGowan, S., Wagner, M., Roberts, C., Armstrong, L. K., Nicholls, D. J. E., Wickham, H. D., Hutchins, M. G., & Bowes, M. J. (2018). Characterisation of a major phytoplankton bloom in the River Thames (UK) using flow cytometry and high performance liquid chromatography. *Science of The Total Environment*, 624, 366–376.
- Morelle, J. & Claquin, P. (2018). Electron requirements for carbon incorporation along a diel light cycle in three marine diatom species. *Photosynthesis Research*, 137(2), 201–214.

- Morelle, J., Schapira, M., & Claquin, P. (2017). Dynamics of phytoplankton productivity and exopolysaccharides (EPS and TEP) pools in the Seine Estuary (France, Normandy) over tidal cycles and over two contrasting seasons. *Marine Environmental Research*, 131, 162–176.
- Morelle, J., Schapira, M., Orvain, F., Riou, P., Lopez, P. J., Pierre-Duplessix, O., Rabiller, E., Maheux, F., Simon, B., & Claquin, P. (2018). Annual Phytoplankton Primary Production Estimation in a Temperate Estuary by Coupling PAM and Carbon Incorporation Methods. *Estuaries and Coasts*, 41(5), 1337–1355.
- Moreno, A. R. & Martiny, A. C. (2018). Ecological Stoichiometry of Ocean Plankton. *Annual Review of Marine Science*, 10(1), 43–69.
- Moscetta, P., Sanfilippo, L., Savino, E., Moscetta, P., Allabashi, R., & Gunatilaka, A. (2009). Instrumentation for continuous monitoring in marine environments. In *OCEANS 2009* (pp. 1–10). ISSN : 0197-7385.
- Moss, B., Kosten, S., Meerhoff, M., Battarbee, R. W., Jeppesen, E., Mazzeo, N., Havens, K., Lacerot, G., Liu, Z., De Meester, L., Paerl, H., & Scheffer, M. (2011). Allied attack : climate change and eutrophication. *Inland Waters*, 1(2), 101–105.
- Moustakas, A. & Karakassis, I. (2005). How Diverse is Aquatic Biodiversity Research? *Aquatic Ecology*, 39(3), 367–375.
- Murphy, K. J. (2002). Plant communities and plant diversity in softwater lakes of northern Europe. *Aquatic Botany*, 73(4), 287–324.
- Ménesguen, A., Desmit, X., Dulière, V., Lacroix, G., Thouvenin, B., Thieu, V., & Dussauze, M. (2018a). How to avoid eutrophication in coastal seas? A new approach to derive river-specific combined nitrate and phosphate maximum concentrations. *Science of The Total Environment*, 628-629, 400–414.
- Ménesguen, A., Dussauze, M., & Dumas, F. (2018b). Designing optimal scenarios of nutrient loading reduction in a WFD/MSFD perspective by using passive tracers in a biogeochemical-3D model of the English Channel/Bay of Biscay area. *Ocean & Coastal Management*, 163, 37–53.
- Ménesguen, A. & Gohin, F. (2006). Observation and modelling of natural retention structures in the English Channel. *Journal of Marine Systems*, 63(3), 244–256.
- Müller, P., Li, X.-P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566.
- Napoléon, C. (2012). *Évolution spatio-temporelle de la production primaire et des communautés phytoplanctoniques en Manche*. These de doctorat, Caen.

- Napoléon, C. & Claquin, P. (2012). Multi-Parametric Relationships between PAM Measurements and Carbon Incorporation, an In Situ Approach. *PLOS ONE*, 7(7), e40284.
- Napoléon, C., Fiant, L., Raimbault, V., Riou, P., & Claquin, P. (2014). Dynamics of phytoplankton diversity structure and primary productivity in the English Channel. *Marine Ecology Progress Series*, 505, 49–64.
- Napoléon, C., Raimbault, V., & Claquin, P. (2013). Influence of Nutrient Stress on the Relationships between PAM Measurements and Carbon Incorporation in Four Phytoplankton Species. *PLOS ONE*, 8(6), e66423.
- 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. *Journal of Sea Research*, 69, 43–52.
- Naumann, E. (1919). Några synpunkter angående limnoplanktons ökologi med särskild hänsyn till fytoplankton. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 13(6), 129–163.
- Nissimov, J. I., Vandzura, R., Johns, C. T., Natale, F., Haramaty, L., & Bidle, K. D. (2018). Dynamics of transparent exopolymer particle production and aggregation during viral infection of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2880–2897.
- Nixon, S. W. (1995). Coastal marine eutrophication : A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41(1), 199–219.
- Nixon, S. W. (2009). Eutrophication and the macroscope. *Hydrobiologia*, 629(1), 5–19.
- Niyogi, K. K., Grossman, A. R., & Björkman, O. (1998). Arabidopsis Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion. *The Plant Cell*, 10(7), 1121–1134.
- Nogueira, P., Domingues, R. B., & Barbosa, A. B. (2014). Are microcosm volume and sample pre-filtration relevant to evaluate phytoplankton growth? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 323–330.
- Norton, T. A., Melkonian, M., & Andersen, R. A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308–326.
- Nwankwegu, A. S., Li, Y., Huang, Y., Wei, J., Norgbey, E., Lai, Q., Sarpong, L., Wang, K., Ji, D., Yang, Z., & Paerl, H. W. (2020). Nutrient addition bioassay and phytoplankton community structure monitored during autumn in Xiangxi Bay of Three Gorges Reservoir, China. *Chemosphere*, 247, 125960.
- Némery, J. & Garnier, J. (2007). Origin and fate of phosphorus in the Seine watershed (France) : Agricultural and hydrographic P budgets. *Journal of Geophysical Research : Biogeosciences*, 112(G3).

- Ní Longphuirt, S., O'Boyle, S., Wilkes, R., Dabrowski, T., & Stengel, D. B. (2016). Influence of Hydrological Regime in Determining the Response of Macroalgal Blooms to Nutrient Loading in Two Irish Estuaries. *Estuaries and Coasts*, 39(2), 478–494.
- Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T., & Kobayashi, M. (2008). Unique photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynthesis Research*, 98(1), 141.
- Oliver, T. H., Heard, M. S., Isaac, N. J. B., Roy, D. B., Procter, D., Eigenbrod, F., Freckleton, R., Hector, A., Orme, C. D. L., Petchey, O. L., Proença, V., Raffaelli, D., Suttle, K. B., Mace, G. M., Martín-López, B., Woodcock, B. A., & Bullock, J. M. (2015). Biodiversity and Resilience of Ecosystem Functions. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(11), 673–684.
- Olli, K., Klais, R., & Tamminen, T. (2015). Rehabilitating the cyanobacteria – niche partitioning, resource use efficiency and phytoplankton community structure during diazotrophic cyanobacterial blooms. *Journal of Ecology*, 103(5), 1153–1164.
- Olson, R. J., Chekalyuk, A. M., & Sosik, H. M. (1996). Phytoplankton photosynthetic characteristics from fluorescence induction assays of individual cells. *Limnology and Oceanography*, 41(6), 1253–1263.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., & Anderson, O. K. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10(5), 636–643.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., & DuRand, M. D. (1993). Phytoplankton Analysis Using Flow Cytometry. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. CRC Press. Num Pages : 12.
- Orbi, A. & Salomon, J.-C. (1988). Dynamique de marée dans le Golfe Normand-Breton. *Oceanologica acta*, 11(1), 55–64.
- Oseji, O. F., Chigbu, P., Oghenekaro, E., Waguespack, Y., & Chen, N. (2018). Spatiotemporal patterns of phytoplankton composition and abundance in the Maryland Coastal Bays : The influence of freshwater discharge and anthropogenic activities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 207, 119–131.
- Otero, J., Álvarez Salgado, X. A., & Bode, A. (2020). Phytoplankton Diversity Effect on Ecosystem Functioning in a Coastal Upwelling System. *Frontiers in Marine Science*, 7.
- Oxborough, K., Moore, C. M., Suggett, D. J., Lawson, T., Chan, H. G., & Geider, R. J. (2012). Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis : a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data. *Limnology and Oceanography : Methods*, 10(3), 142–154.

- O'Higgins, T., Ferraro, S., Dantin, D., Jordan, S., & Chintala, M. (2010). Habitat Scale Mapping of Fisheries Ecosystem Service Values in Estuaries. *Ecology and Society*, 15(4).
- Paczkowska, J., Rowe, O. F., Figueroa, D., & Andersson, A. (2019). Drivers of phytoplankton production and community structure in nutrient-poor estuaries receiving terrestrial organic inflow. *Marine Environmental Research*, 151, 104778.
- Paerl, H. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In H. K. Hudnell (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms : State of the Science and Research Needs*, Advances in Experimental Medicine and Biology (pp. 217–237). New York, NY : Springer.
- Paerl, H. W., Hall, N. S., Peierls, B. L., & Rossignol, K. L. (2014). Evolving Paradigms and Challenges in Estuarine and Coastal Eutrophication Dynamics in a Culturally and Climatically Stressed World. *Estuaries and Coasts*, 37(2), 243–258.
- Paerl, H. W., Otten, T. G., & Kudela, R. (2018). Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum. *Environmental Science & Technology*, 52(10), 5519–5529.
- Paerl, R. W., Venezia, R. E., Sanchez, J. J., & Paerl, H. W. (2020). Picophytoplankton dynamics in a large temperate estuary and impacts of extreme storm events. *Scientific Reports*, 10(1), 22026.
- Pandey, U. & Pandey, J. (2015). The Skewed N :P Stoichiometry Resulting from Anthropogenic Drivers Regulate Production of Transparent Exopolymer Particles (TEP) in Ganga River. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(1), 118–124.
- Pannard, A., Souchu, P., Chauvin, C., & Gross, E. (2017). Définition scientifique de l'eutrophisation. In *L'eutrophisation : manifestations, causes, conséquences et prédictibilité. Rapport d'Expertise scientifique collective, Rapport CNRS- Ifremer-INRA-Irstea (France), 1283 pages.* (pp. 14–81).
- Parinos, C., Gogou, A., Krasakopoulou, E., Lagaria, A., Giannakourou, A., Karageorgis, A. P., & Psarra, S. (2017). Transparent Exopolymer Particles (TEP) in the NE Aegean Sea frontal area : Seasonal dynamics under the influence of Black Sea water. *Continental Shelf Research*, 149, 112–123.
- Park, M. G., Cooney, S. K., Yih, W., & Coats, D. W. (2002). Effects of two strains of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya* on growth, photosynthesis, light absorption, and quantum yield of bloom-forming dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, 227, 281–292.
- Parkhill, J.-P., Maillet, G., & Cullen, J. J. (2001). Fluorescence-Based Maximal Quantum Yield for Psii as a Diagnostic of Nutrient Stress. *Journal of Phycology*, 37(4), 517–529.

- Passow, U. (2002). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography*, 55(3), 287–333.
- Passow, U. & Alldredge, A. L. (1996). A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Oceanographic Literature Review*, 7(43), 669.
- Passy, P., Gendre, R. L., Garnier, J., Cugier, P., Callens, J., Paris, F., Billen, G., Riou, P., & Romero, E. (2016). Eutrophication modelling chain for improved management strategies to prevent algal blooms in the Bay of Seine. *Marine Ecology Progress Series*, 543, 107–125.
- Pearcy, R. W. (1990). Sunflecks and Photosynthesis in Plant Canopies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), 421–453.
- Peñuelas, J., Janssens, I. A., Ciais, P., Obersteiner, M., & Sardans, J. (2020). Anthropogenic global shifts in biospheric N and P concentrations and ratios and their impacts on biodiversity, ecosystem productivity, food security, and human health. *Global Change Biology*, 26(4), 1962–1985.
- Perry, M. J. & Porter, S. M. (1989). Determination of the cross-section absorption coefficient of individual phytoplankton cells by analytical flow cytometry. *Limnology and Oceanography*, 34(8), 1727–1738.
- Peñuelas, J., Poulter, B., Sardans, J., Ciais, P., van der Velde, M., Bopp, L., Boucher, O., Godderis, Y., Hinsinger, P., Llusia, J., Nardin, E., Vicca, S., Obersteiner, M., & Janssens, I. A. (2013). Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications*, 4(1), 2934.
- Peñuelas, J. & Sardans, J. (2022). The global nitrogen-phosphorus imbalance. *Science*.
- Piehl, M. F., Twomey, L. J., Hall, N. S., & Paerl, H. W. (2004). Impacts of inorganic nutrient enrichment on phytoplankton community structure and function in Pamlico Sound, NC, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61(2), 197–209.
- Pinay, G., Gascuel, C., Menesguen, A., Souchon, Y., Moal, M. L., Aissani, L., Anschutz, P., Barthélemy, C., Béline, F., Bornette, G., Bourblanc, M., Boutin, C., Chapelle, A., Chauvin, C., Claquin, P., Crave, A., Denoroy, P., Dorioz, J. M., Douguet, J.-M., Doussan, I., Durand, P., Etrillard, C., Euzen, A., Gascuel, D., Gross, E., Hoepffner, N., Humbert, J. F., Lacroix, G., Pape, O. L., Lefebvre, A., Lescot, J.-M., Levain, A., Miossec, L., Moatar, F., Mostajir, B., Pannard, A., Rimet, F., Rossi, N., Sanchez-Perez, J.-M., Sauvage, S., Souchu, P., Terreaux, J.-P., Usseglio-Polatera, P., & Vinçon-Leite, B. (2017). *Eutrophication. Manifestations, causes, conséquences et prédictibilité. Rapport de l'Expertise scientifique collective*. report, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER);

- Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) ; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
- Pinckney, J. L., Paerl, H. W., Tester, P., & Richardson, T. L. (2001). The role of nutrient loading and eutrophication in estuarine ecology. *Environmental Health Perspectives*, 109(suppl 5), 699–706.
- Poikane, S., Salas Herrero, F., Kelly, M. G., Borja, A., Birk, S., & van de Bund, W. (2020). European aquatic ecological assessment methods : A critical review of their sensitivity to key pressures. *Science of The Total Environment*, 740, 140075.
- Powles, S. B. (1984). Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 15–44.
- Pozdnyakov, D. V., Pettersson, L. H., & Korosov, A. A. (2017). Investigation of Harmful/Nuisance Algae Blooms in Marine Environments. In D. V. Pozdnyakov, L. H. Pettersson, & A. A. Korosov (Eds.), *Exploring the Marine Ecology from Space : Experience from Russian-Norwegian cooperation*, Springer Remote Sensing/Photogrammetry (pp. 95–140).
- Prasil, O., Suggett, D. J., Cullen, J. J., Babin, M., & Govindjee (2008). Aquafluo 2007 : chlorophyll fluorescence in aquatic sciences, an international conference held in Nové Hradý. *Photosynthesis Research*, 95(1), 111–115.
- Probyn, T. A. & Painting, S. J. (1985). Nitrogen uptake by size-fractionated phytoplankton populations in Antarctic surface waters1. *Limnology and Oceanography*, 30(6), 1327–1332.
- Proctor, C. W. & Roesler, C. S. (2010). New insights on obtaining phytoplankton concentration and composition from in situ multispectral Chlorophyll fluorescence. *Limnology and Oceanography : Methods*, 8(12), 695–708.
- Ptacnik, R., Andersen, T., & Tamminen, T. (2010). Performance of the Redfield Ratio and a Family of Nutrient Limitation Indicators as Thresholds for Phytoplankton N vs. P Limitation. *Ecosystems*, 13(8), 1201–1214.
- Ptacnik, R., Jenerette, G. D., Verschoor, A. M., Huberty, A. F., Solimini, A. G., & Brookes, J. D. (2005). Applications of ecological stoichiometry for sustainable acquisition of ecosystem services. *Oikos*, 109(1), 52–62.
- Ptacnik, R., Solimini, A. G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepistö, L., Willén, E., & Rekolainen, S. (2008). Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5134–5138.

- Purcell, J. E. (2012). Jellyfish and Ctenophore Blooms Coincide with Human Proliferations and Environmental Perturbations. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 209–235.
- Qi, H., Wang, J., & Wang, Z. (2013). A comparative study of maximal quantum yield of photosystem II to determine nitrogen and phosphorus limitation on two marine algae. *Journal of Sea Research*, 80, 1–11.
- Qin, X., Shi, X., Gao, Y., Dai, X., Ou, L., Guan, W., Lu, S., Cen, J., & Qi, Y. (2021). Alkaline phosphatase activity during a phosphate replete dinoflagellate bloom caused by *Prorocentrum obtusidens*. *Harmful Algae*, 103, 101979.
- Quigg, A., Santschi, P. H., Burd, A., Chin, W.-C., Kamalanathan, M., Xu, C., & Ziervogel, K. (2021). From Nano-Gels to Marine Snow : A Synthesis of Gel Formation Processes and Modeling Efforts Involved with Particle Flux in the Ocean. *Gels*, 7(3), 114.
- Quinlan, E. L., Jett, C. H., & Philips, E. J. (2009). Microzooplankton grazing and the control of phytoplankton biomass in the Suwannee River estuary, USA. *Hydrobiologia*, 632(1), 127–137.
- Rabalais, N. N., Turner, R. E., Díaz, R. J., & Justić, D. (2009). Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, 66(7), 1528–1537.
- Radi, T., Pospelova, V., de Vernal, A., & Vaughn Barrie, J. (2007). Dinoflagellate cysts as indicators of water quality and productivity in British Columbia estuarine environments. *Marine Micropaleontology*, 62(4), 269–297.
- Raffard, A., Santoul, F., Cucherousset, J., & Blanchet, S. (2019). The community and ecosystem consequences of intraspecific diversity : a meta-analysis. *Biological Reviews*, 94(2), 648–661.
- Rahav, E., Raveh, O., Hazan, O., Gordon, N., Kress, N., Silverman, J., & Herut, B. (2018). Impact of nutrient enrichment on productivity of coastal water along the SE Mediterranean shore of Israel - A bioassay approach. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 559–567.
- Raimonet, M., Thieu, V., Silvestre, M., Oudin, L., Rabouille, C., Vautard, R., & Garnier, J. (2018). Landward Perspective of Coastal Eutrophication Potential Under Future Climate Change : The Seine River Case (France). *Frontiers in Marine Science*, 5, 136.
- Raoux, A., Baux, N., Pezy, J.-P., Balay, P., Lesourd, S., & Dauvin, J.-C. (2020). Evaluating ecosystem functioning of a long-term dumping site in the Bay of Seine (English Channel). *Ecological Indicators*, 115, 106381.
- Raven, J. A. (2011). The cost of photoinhibition. *Physiologia Plantarum*, 142(1), 87–104.

- Raven, J. A. & Geider, R. J. (2003). Adaptation, Acclimation and Regulation in Algal Photosynthesis. In A. W. D. Larkum, S. E. Douglas, & J. A. Raven (Eds.), *Photosynthesis in Algae*, Advances in Photosynthesis and Respiration (pp. 385–412). Dordrecht : Springer Netherlands.
- Redfield, A. C. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46(3), 230A–221. Publisher : Sigma Xi, The Scientific Research Society.
- Reed, M. L., Pinckney, J. L., Keppler, C. J., Brock, L. M., Hogan, S. B., & Greenfield, D. I. (2016). The influence of nitrogen and phosphorus on phytoplankton growth and assemblage composition in four coastal, southeastern USA systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 177, 71–82.
- Reynolds, C. S. (1984). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge ; New York : Cambridge University Press.
- Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton*. Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge : Cambridge University Press.
- Robinson, A. R. & Brink, K. H., Eds. (2005). *The Sea, Volume 13 : The Global Coastal Ocean : Multiscale Interdisciplinary Processes*. New York : Harvard University Press.
- Rodhe, W. (1969). Crystallization of eutrophication concepts in northern Europe.
- Roessink, I., Koelmans, A. A., & Brock, T. C. M. (2008). Interactions between nutrients and organic micro-pollutants in shallow freshwater model ecosystems. *Science of The Total Environment*, 406(3), 436–442.
- Roessink, I., Moermond, C. T. A., Gillissen, F., & Koelmans, A. A. (2010). Impacts of manipulated regime shifts in shallow lake model ecosystems on the fate of hydrophobic organic compounds. *Water Research*, 44(20), 6153–6163.
- Rohlich, G. A. (1980). *Eutrophication : Causes, Consequence, Correctives*. Washington : National Academy of Sciences.
- Rojo, C., Cobelas, M. A., & Arauzo, M. (1994). An elementary, structural analysis of river phytoplankton. *Hydrobiologia*, 289(1), 43–55.
- Romero, E., Garnier, J., Lassaletta, L., Billen, G., Le Gendre, R., Riou, P., & Cugier, P. (2013). Large-scale patterns of river inputs in southwestern Europe : seasonal and interannual variations and potential eutrophication effects at the coastal zone. *Biogeochemistry*, 113(1), 481–505.
- Romero, E., Le Gendre, R., Garnier, J., Billen, G., Fisson, C., Silvestre, M., & Riou, P. (2016). Long-term water quality in the lower Seine : Lessons learned over 4 decades of monitoring. *Environmental Science & Policy*, 58, 141–154.

- Rose, C. & Axler, R. P. (1997). Uses of alkaline phosphatase activity in evaluating phytoplankton community phosphorus deficiency. *Hydrobiologia*, 361(1), 145–156.
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching : Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. *Plant Physiology*, 170(4), 1903–1916.
- Rychtecký, P., Řeháková, K., Kozlíková, E., & Vrba, J. (2015). Light Availability May Control Extracellular Phosphatase Production in Turbid Environments. *Microbial Ecology*, 69(1), 37–44.
- Saccà, A. (2017). Methods for the estimation of the biovolume of microorganisms : A critical review. *Limnology and Oceanography : Methods*, 15(4), 337–348.
- Saeck, E. A., O'Brien, K. R., & Burford, M. A. (2016). Nitrogen response of natural phytoplankton communities : : a new indicator based on photosynthetic efficiency Fv/Fm. *Marine Ecology Progress Series*, 552, 81–92.
- Saito, M. A., Goepfert, T. J., & Ritt, J. T. (2008). Some thoughts on the concept of colimitation : Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography*, 53(1), 276–290.
- Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P. G., Kiefer, D. A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J., & Takahashi, M. (1997). Parameters of photosynthesis : definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research*, 19(11), 1637–1670.
- Salmaso, N., Naselli-Flores, L., & Padisák, J. (2015). Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshwater Biology*, 60(4), 603–619.
- Santhanam, P., Pachiappan, P., & Begum, A. (2019). Methods of Collection, Preservation and Taxonomic Identification of Marine Phytoplankton. In P. Santhanam, A. Begum, & P. Pachiappan (Eds.), *Basic and Applied Phytoplankton Biology* (pp. 25–61).
- Santos, A. M. C., Carneiro, F. M., & Cianciaruso, M. V. (2015). Predicting productivity in tropical reservoirs : The roles of phytoplankton taxonomic and functional diversity. *Ecological Indicators*, 48, 428–435.
- Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S., & Tréguer, P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean : a review. *Journal of Sea Research*, 53(1), 25–42.
- Sautour, B., Artigas, L., Delmas, D., Herbland, A., & Laborde, P. (2000). Grazing impact of micro- and mesozooplankton during a spring situation in coastal waters off the Gironde estuary. *Journal of Plankton Research*, 22(3), 531–552.
- Schindler, D. W., Carpenter, S. R., Chapra, S. C., Hecky, R. E., & Orihel, D. M. (2016). Reducing Phosphorus to Curb Lake Eutrophication is a Success. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 8923–8929.

- Schindler, D. W., Carpenter, S. R., Chapra, S. C., Hecky, R. E., & Orihel, D. M. (2017). Response to the Letter, Nitrogen is Not a “House of Cards”. *Environmental Science & Technology*, 51(4), 1943–1943.
- Schreiber, U. & Bilger, W. (1993). Progress in Chlorophyll Fluorescence Research : Major Developments During the Past Years in Retrospect. In H.-D. Behnke, U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit, & M. Runge (Eds.), *Progress in Botany / Fortschritte der Botanik : Structural Botany Physiology Genetics Taxonomy Geobotany / Struktur Physiologie Genetik Systematik Geobotanik*, Progress in Botany/Fortschritte der Botanik (pp. 151–173). Berlin, Heidelberg : Springer.
- Schreiber, U., Bilger, W., & Neubauer, C. (1995a). Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. In E.-D. Schulze & M. M. Caldwell (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*, Springer Study Edition (pp. 49–70). Berlin, Heidelberg : Springer.
- Schreiber, U., Hormann, H., Neubauer, C., & Klughammer, C. (1995b). Assessment of Photosystem II Photochemical Quantum Yield by Chlorophyll Fluorescence Quenching Analysis. *Functional Plant Biology*, 22(2), 209–220.
- Schreiber, U., Schliwa, U., & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1), 51–62.
- Schroeder, D. C., Oke, J., Hall, M., Malin, G., & Wilson, W. H. (2003). Virus Succession Observed during an *Emiliana huxleyi* Bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2484–2490.
- Schulhof, M. A., Van de Waal, D. B., Declerck, S. A. J., & Shurin, J. B. (2022). Phytoplankton functional composition determines limitation by nutrients and grazers across a lake productivity gradient. *Ecosphere*, 13(3), e4008.
- Serre-Fredj, L., Chasselin, L., Jolly, O., Jacqueline, F., & Claquin, P. (2022). Colimitation assessment of phytoplankton growth using a resource use efficiency approach in the Bay of Seine (French-English Channel). *Journal of Environmental Management*, 306, 114487.
- Serre-Fredj, L., Jacqueline, F., Navon, M., Isabel, G., Chasselin, L., Jolly, O., Repecaud, M., & Claquin, P. (2021). Coupling high frequency monitoring and bioassay experiments to investigate a harmful algal bloom in the Bay of Seine (French-English Channel). *Marine Pollution Bulletin*, 168, 112387.
- Sferratore, A., Garnier, J., Billen, G., Conley, D. J., & Pinault, S. (2006). Diffuse and Point Sources of Silica in the Seine River Watershed. *Environmental Science & Technology*, 40(21), 6630–6635.

- Sharkey, T. D. (2019). Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle. *Photosynthesis Research*, 140(2), 235–252.
- Shen, A., Ishizaka, J., Yang, M., Ouyang, L., Yin, Y., & Ma, Z. (2019). Changes in community structure and photosynthetic activities of total phytoplankton species during the growth, maintenance, and dissipation phases of a *Prorocentrum donghaiense* bloom. *Harmful Algae*, 82, 35–43.
- Shen, Z. L. (2001). Historical Changes in Nutrient Structure and its Influences on Phytoplankton Composition in Jiaozhou Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52(2), 211–224.
- Siano, R., Chapelle, A., Antoine, V., Michel-Guillou, E., Rigaut-Jalabert, F., Guillou, L., Hégaret, H., Leynaert, A., & Curd, A. (2018). Citizen participation in monitoring phytoplankton seawater discolorations. *Marine Policy*.
- Siano, R., Lassudrie, M., Cuzin, P., Briant, N., Loizeau, V., Schmidt, S., Ehrhold, A., Mertens, K. N., Lambert, C., Quintric, L., Noël, C., Latimier, M., Quéré, J., Durand, P., & Penaud, A. (2021). Sediment archives reveal irreversible shifts in plankton communities after World War II and agricultural pollution. *Current Biology*.
- Sicko-Goad, L. M., Schelske, C. L., & Stoermer, E. F. (1984). Estimation of intracellular carbon and silica content of diatoms from natural assemblages using morphometric techniques1. *Limnology and Oceanography*, 29(6), 1170–1178.
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1256–1263.
- Silsbe, G. M. & Kromkamp, J. C. (2012). Modeling the irradiance dependency of the quantum efficiency of photosynthesis. *Limnology and Oceanography : Methods*, 10(9), 645–652.
- Silsbe, G. M., Oxborough, K., Suggett, D. J., Forster, R. M., Ihnken, S., Komárek, O., Lawrenz, E., Prášil, O., Röttgers, R., Šicner, M., Simis, S. G. H., Dijk, M. A. V., & Kromkamp, J. C. (2015). Toward autonomous measurements of photosynthetic electron transport rates : An evaluation of active fluorescence-based measurements of photochemistry. *Limnology and Oceanography : Methods*, 13(3), e10014.
- Sim, L. N., Suwarno, S. R., Lee, D. Y. S., Cornelissen, E. R., Fane, A. G., & Chong, T. H. (2019). Online monitoring of transparent exopolymer particles (TEP) by a novel membrane-based spectrophotometric method. *Chemosphere*, 220, 107–115.
- Simon, N., Cras, A.-L., Foulon, E., & Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes Rendus Biologies*, 332(2-3), 159–170.

- Sin, Y., Hyun, B., Bach, Q.-D., Yang, S., & Park, C. (2012). Phytoplankton Size and Taxonomic Composition in a Temperate Estuary Influenced by Monsoon. *Estuaries and Coasts*, 35(3), 839–852.
- Sin, Y., Hyun, B., Jeong, B., & Soh, H. Y. (2013). Impacts of eutrophic freshwater inputs on water quality and phytoplankton size structure in a temperate estuary altered by a sea dike. *Marine Environmental Research*, 85, 54–63.
- Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera d'Alcalá, M., Vaqué, D., & Zingone, A. (2010). Plankton in the open Mediterranean Sea : a review. *Biogeosciences*, 7(5), 1543–1586.
- Slawyk, G., Collos, Y., & Auclair, J.-C. (1977). The use of the ^{13}C and ^{15}N isotopes for the simultaneous measurement of carbon and nitrogen turnover rates in marine phytoplankton1. *Limnology and Oceanography*, 22(5), 925–932.
- Smayda, T. J. (1997). Harmful algal blooms : Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42(5part2), 1137–1153.
- Smil, V. (2004). *Enriching the Earth : Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*. Cambridge, Mass. London : The MIT Press, new e. édition edition.
- Smith, V. H., Joye, S. B., & Howarth, R. W. (2006). Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 51(1part2), 351–355.
- Smith, V. H. & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science : where do we go from here ? *Trends in Ecology & Evolution*, 24(4), 201–207.
- Solbrig, O. T. (1994). Plant Traits and Adaptive Strategies : Their Role in Ecosystem Function. In E.-D. Schulze & H. A. Mooney (Eds.), *Biodiversity and Ecosystem Function*, Praktische Zahnmedizin Odonto-Stomatologie Pratique Practical Dental Medicine (pp. 97–116). Berlin, Heidelberg : Springer.
- Song, X., Tan, M., Xu, G., Su, X., Liu, J., Ni, G., Li, Y., Tan, Y., Huang, L., Shen, P., & Li, G. (2019). Is phosphorus a limiting factor to regulate the growth of phytoplankton in Daya Bay, northern South China Sea : a mesocosm experiment. *Ecotoxicology*, 28(5), 559–568.
- Song, Y., Shen, L., Zhang, L., Li, J., & Chen, M. (2021). Study of a hydrodynamic threshold system for controlling dinoflagellate blooms in reservoirs. *Environmental Pollution*, 278, 116822.
- Sournia, A., Belin, C., Billard, C., Catherine, M., Erard-Le Denn, E., Fresnel, J., Lassus, P., Pastoureaud, A., & Soulard, R. (1992). The repetitive and expanding occurrence of a green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coasts of France. *Cryptogamie Algologie*, 13(1), 1–13.

- Sournia, A., Chrdtiennot-Dinet, M.-J., & Ricard, M. (1991). Marine phytoplankton : how many species in the world ocean? *Journal of Plankton Research*, 13(5), 1093–1099.
- Spilling, K., Olli, K., Lehtoranta, J., Kremp, A., Tedesco, L., Tamelander, T., Klais, R., Peltonen, H., & Tamminen, T. (2018). Shifting Diatom—Dinoflagellate Dominance During Spring Bloom in the Baltic Sea and its Potential Effects on Biogeochemical Cycling. *Frontiers in Marine Science*, 5.
- Steeman-Nielson, E. (1952). The use of radioactive carbon (C14) for measuring organic production in the sea. J. Conseil, Conseil Perm. Intern. Exploration Mer. 18 : 117-140.. 1965. On the determination of the activity in 14C-ampoules for measuring primary production. *Limnol. Oceanog.* 1_0 (suppl.), 247, 252.
- Stirbet, A. & Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II : Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 104(1), 236–257.
- Stoecker, D. K., Hansen, P. J., Caron, D. A., & Mitra, A. (2017). Mixotrophy in the Marine Plankton. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), 311–335.
- Stramski, D., Sciandra, A., & Claustre, H. (2002). Effects of temperature, nitrogen, and light limitation on the optical properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 392–403.
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*, 310.
- Striebel, M., Behl, S., & Stibor, H. (2009). The coupling of biodiversity and productivity in phytoplankton communities : consequences for biomass stoichiometry. *Ecology*, 90(8), 2025–2031.
- Struyf, E. & Conley, D. J. (2009). Silica : an essential nutrient in wetland biogeochemistry. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(2), 88–94.
- Stumpner, E. B., Bergamaschi, B. A., Kraus, T. E. C., Parker, A. E., Wilkerson, F. P., Downing, B. D., Dugdale, R. C., Murrell, M. C., Carpenter, K. D., Orlando, J. L., & Kendall, C. (2020). Spatial variability of phytoplankton in a shallow tidal freshwater system reveals complex controls on abundance and community structure. *Science of The Total Environment*, 700, 134392.
- Suggett, D. J., Borowitzka, M. A., & Prášil, O. (2010). *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences : Methods and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Suggett, D. J., MacIntyre, H. L., Kana, T. M., & Geider, R. J. (2009). Comparing electron transport with gas exchange : parameterising exchange rates between alternative photosynthetic currencies for eukaryotic phytoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 147–162.

- Sun, J., Liu, M., Wang, P., Gao, Z., Mu, J., & Chen, Q. (2020). Novel High-Selectivity Fluorescent Probe for Detecting Alkaline Phosphatase Activity in Marine Environment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(6), 3348–3355.
- Sun, K.-M., Xin, M., Sun, P., Li, Y., Li, R., Tang, X., & Wang, Z. (2019). Photosynthetic activity of *Prorocentrum donghaiense* Lu acclimated to phosphorus limitation and its photosynthetic responses to nutrient depletion. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1721–1732.
- Sylvan, J. B., Quigg, A., Tozzi, S., & Ammerman, J. W. (2007). Eutrophication-induced phosphorus limitation in the Mississippi River plume : Evidence from fast repetition rate fluorometry. *Limnology and Oceanography*, 52(6), 2679–2685.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plants Physiology*. Sunderland, MA : Sinauer Associates Inc.
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae : Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118. Number : 6 Publisher : Molecular Diversity Preservation International.
- Tamminen, T. & Andersen, T. (2007). Seasonal phytoplankton nutrient limitation patterns as revealed by bioassays over Baltic Sea gradients of salinity and eutrophication. *Marine Ecology Progress Series*, 340, 121–138.
- Tan, L., Xu, W., He, X., & Wang, J. (2019). The feasibility of Fv/Fm on judging nutrient limitation of marine algae through indoor simulation and in situ experiment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 229, 106411.
- Tanaka, T., Henriksen, P., Lignell, R., Olli, K., Seppälä, J., Tamminen, T., & Thingstad, T. F. (2006). Specific Affinity for Phosphate Uptake and Specific Alkaline Phosphatase Activity as Diagnostic Tools for Detecting Phosphorus-Limited Phytoplankton and Bacteria. *Estuaries and Coasts*, 29(6), 1226–1241.
- Tanaka, T., Thingstad, T. F., Løvdal, T., Grossart, H.-P., Larsen, A., Schulz, K. G., & Riebesell, U. (2007). Availability of phosphate for phytoplankton and bacteria and of labile organic carbon for bacteria at different pCO₂ levels in a mesocosm study. *Biogeosciences Discussions*, 4(6), 3937–3960.
- Tas, S., Yilmaz, I. N., & Okus, E. (2009). Phytoplankton as an Indicator of Improving Water Quality in the Golden Horn Estuary. *Estuaries and Coasts*, 32(6), 1205.
- Tett, P. & Barton, E. D. (1995). Why are there about 5000 species of phytoplankton in the sea? *Journal of Plankton Research*, 17(8), 1693–1704.
- Tett, P. & Lee, J.-Y. (2005). N :Si ratios and the ‘balance of organisms’ : PROWQM simulations of the northern North Sea. *Journal of Sea Research*, 54(1), 70–91.

- Thienneman, A. (1918). Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Sauerstoffgehalt des Wassers und der Zusammensetzung der Fana in norddeutschen Seen. *Arch Hydrobiol*, 12, 1–65.
- 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.
- Thornton, D. (2002). Diatom aggregation in the sea : mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology*, 37(2), 149–161.
- Thyssen, M., Beker, B., Ediger, D., Yilmaz, D., Garcia, N., & Denis, M. (2011). Phytoplankton distribution during two contrasted summers in a Mediterranean harbour : combining automated submersible flow cytometry with conventional techniques. *Environmental Monitoring and Assessment*, 173(1), 1–16.
- 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. (2014). Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea : influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Thyssen, M., Tarran, G. A., Zubkov, M. V., Holland, R. J., Grégori, G., Burkill, P. H., & Denis, M. (2008). The emergence of automated high-frequency flow cytometry : revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*, 30(3), 333–343.
- Tilman, D., Isbell, F., & Cowles, J. M. (2014). Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45(1), 471–493.
- Tiselius, P. & Kuylenstierna, M. (1996). Growth and decline of a diatom spring bloom phytoplankton species composition, formation of marine snow and the role of heterotrophic dinoflagellates. *Journal of Plankton Research*, 18(2), 133–155.
- Topcu, D. & Brockmann, U. (2021). Consistency of thresholds for eutrophication assessments, examples and recommendations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(10), 677.
- Tragin, M. & Vaultot, D. (2019). Novel diversity within marine Mamiellophyceae (Chlorophyta) unveiled by metabarcoding. *Scientific Reports*, 9(1), 5190. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.
- Tucker, C. M., Cadotte, M. W., Carvalho, S. B., Davies, T. J., Ferrier, S., Fritz, S. A., Grenyer, R., Helmus, M. R., Jin, L. S., Mooers, A. O., Pavoine, S., Purschke, O.,

- Redding, D. W., Rosauer, D. F., Winter, M., & Mazel, F. (2017). A guide to phylogenetic metrics for conservation, community ecology and macroecology. *Biological Reviews*, 92(2), 698–715.
- 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 Biogeochemical Cycles*, 24(3).
- Vallina, S. M., Cermenio, P., Dutkiewicz, S., Loreau, M., & Montoya, J. M. (2017). Phytoplankton functional diversity increases ecosystem productivity and stability. *Ecological Modelling*, 361, 184–196.
- Van der Plas, F. (2019). Biodiversity and ecosystem functioning in naturally assembled communities. *Biological Reviews*, 94(4), 1220–1245.
- Van Meerssche, E. & Pinckney, J. L. (2019). Nutrient Loading Impacts on Estuarine Phytoplankton Size and Community Composition : Community-Based Indicators of Eutrophication. *Estuaries and Coasts*, 42(2), 504–512.
- Veldhuis, M. J. W., Venekamp, L. A. H., & Ietswaart, T. (1987). Availability of phosphorus sources for blooms of phaeocystis pouchetii (haptophyceae) in the north sea : Impact of the river rhine. *Netherlands Journal of Sea Research*, 21(3), 219–229.
- Via-Ordorika, L., Bouaïcha, N., Rippka, R., Couté, A., Marsac, N. T. d., & Puiseux-Dao, S. (1998). Toxicity of some cyanobacteria isolated from surface waters in the Paris region. *Toxicon*, 12(36), 1748.
- Viles, H. & Spencer, T. (2013). *Coastal Problems : Geomorphology, Ecology and Society at the Coast*. London : Routledge.
- Villacorte, L. O., Ekowati, Y., Calix-Ponce, H. N., Schippers, J. C., Amy, G. L., & Kennedy, M. D. (2015). Improved method for measuring transparent exopolymer particles (TEP) and their precursors in fresh and saline water. *Water Research*, 70, 300–312.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, 277(5325), 494–499.
- Vivier, B. (2021). *Rôle de la colonnisation d'infrastructures marines sur la production et la biodiversité des écosystèmes côtiers en Manche*. These de doctorat, Normandie.
- Walve, J. & Larsson, U. (2007). Blooms of Baltic Sea Aphanizomenon sp. (Cyanobacteria) collapse after internal phosphorus depletion. *Aquatic Microbial Ecology*, 49(1), 57–69.
- Wang, J., Bouwman, A. F., Liu, X., Beusen, A. H. W., Van Dingenen, R., Dentener, F., Yao, Y., Glibert, P. M., Ran, X., Yao, Q., Xu, B., Yu, R., Middelburg, J. J., & Yu, Z. (2021). Harmful Algal Blooms in Chinese Coastal Waters Will Persist Due to Perturbed Nutrient Ratios. *Environmental Science & Technology Letters*, 8(3), 276–284.

- Wang, Y., Li, G., Shi, F., Dong, J., Gentekaki, E., Zou, S., Zhu, P., Zhang, X., & Gong, J. (2020). Taxonomic Diversity of Pico-/Nanoeukaryotes Is Related to Dissolved Oxygen and Productivity, but Functional Composition Is Shaped by Limiting Nutrients in Eutrophic Coastal Oceans. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Wang, Z.-h., Liang, Y., & Kang, W. (2011). Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa. *Harmful Algae*, 12, 113–118.
- Wasmund, N. (2017). The Diatom/Dinoflagellate Index as an Indicator of Ecosystem Changes in the Baltic Sea. 2. Historical Data for Use in Determination of Good Environmental Status. *Frontiers in Marine Science*, 4.
- Watanabe, K., Kasai, A., Fukuzaki, K., Ueno, M., & Yamashita, Y. (2017). Estuarine circulation-driven entrainment of oceanic nutrients fuels coastal phytoplankton in an open coastal system in Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 184, 126–137.
- Webb, W. L., Newton, M., & Starr, D. (1974). Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra* : A mathematical model. *Oecologia*, 17(4), 281–291.
- Weber, K. A. (1907). Aufbau und vegetation der Moore Norddeutschlands.
- Weithoff, G., Walz, N., & Gaedke, U. (2001). The intermediate disturbance hypothesis—species diversity or functional diversity? *Journal of Plankton Research*, 23(10), 1147–1155.
- Westphal, K., Musolff, A., Graeber, D., & Borchardt, D. (2020). Controls of point and diffuse sources lowered riverine nutrient concentrations asynchronously, thereby warping molar N :P ratios. *Environmental Research Letters*, 15(10), 104009.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology : Lake and River Ecosystems*. Gulf Professional Publishing.
- Widdicombe, C. E., Eloire, D., Harbour, D., Harris, R. P., & Somerfield, P. J. (2010). Long-term phytoplankton community dynamics in the Western English Channel. *Journal of Plankton Research*, 32(5), 643–655.
- Wollschläger, J., Wiltshire, K. H., Petersen, W., & Metfies, K. (2015). Analysis of phytoplankton distribution and community structure in the German Bight with respect to the different size classes. *Journal of Sea Research*, 99, 83–96.
- Wongsansilp, T., Juntawong, N., & Wu, Z. (2016). Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. *Journal of Biological Research-Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 89(2), 51–55.
- Wu, J.-T. & Chou, T.-L. (2003). Silicate as the limiting nutrient for phytoplankton in a subtropical eutrophic estuary of Taiwan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58(1), 155–162.

- Wu, Z., Zeng, B., Li, R., & Song, L. (2012). Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. *Harmful Algae*, 15, 53–58.
- Xiao, W., Liu, X., Irwin, A. J., Laws, E. A., Wang, L., Chen, B., Zeng, Y., & Huang, B. (2018). Warming and eutrophication combine to restructure diatoms and dinoflagellates. *Water Research*, 128, 206–216.
- Xin, M., Wang, B., Xie, L., Sun, X., Wei, Q., Liang, S., & Chen, K. (2019). Long-term changes in nutrient regimes and their ecological effects in the Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 562–573.
- Xu, H., Paerl, H. W., Qin, B., Zhu, G., & Gao, G. (2010). Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake Taihu, China. *Limnology and Oceanography*, 55(1), 420–432.
- Xu, R., Zhang, L., & Liu, J. (2021). Rotifers release a lipid-soluble agent that inhibits photosynthetic electron transport in *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 57–65.
- Yang, J. R., Yu, X., Chen, H., Kuo, Y.-M., & Yang, J. (2021). Structural and functional variations of phytoplankton communities in the face of multiple disturbances. *Journal of Environmental Sciences*, 100, 287–297.
- Yang, Y., Chen, H., Abdullah Al, M., Ndayishimiye, J. C., Yang, J. R., Isabwe, A., Luo, A., & Yang, J. (2022). Urbanization reduces resource use efficiency of phytoplankton community by altering the environment and decreasing biodiversity. *Journal of Environmental Sciences*, 112, 140–151.
- Yang, Y., Pan, J., Han, B.-P., & Naselli-Flores, L. (2020). The effects of absolute and relative nutrient concentrations (N/P) on phytoplankton in a subtropical reservoir. *Ecological Indicators*, 115, 106466.
- Ye, L., Chang, C.-W., Matsuzaki, S.-i. S., Takamura, N., Widdicombe, C. E., & Hsieh, C.-h. (2019). Functional diversity promotes phytoplankton resource use efficiency. *Journal of Ecology*, 107(5), 2353–2363.
- You, X., Huang, C., Luo, Y., Shi, G., Zhou, T., & Deng, J. (2020). A smartphone-based platform for point-of-use determination of alkaline phosphatase as an indicator of water eutrophication. *Microchimica Acta*, 187(6), 354.
- Young, J. N. & Schmidt, K. (2020). It's what's inside that matters : physiological adaptations of high-latitude marine microalgae to environmental change. *New Phytologist*, 227(5), 1307–1318.

- Yuan, Y., Bi, Y., & Hu, Z. (2017). Phytoplankton communities determine the spatio-temporal heterogeneity of alkaline phosphatase activity : evidence from a tributary of the Three Gorges Reservoir. *Scientific Reports*, 7(1), 16404.
- Zaoli, S., Giometto, A., Marañón, E., Escrig, S., Meibom, A., Ahluwalia, A., Stocker, R., Maritan, A., & Rinaldo, A. (2019). Generalized size scaling of metabolic rates based on single-cell measurements with freshwater phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(35), 17323–17329.
- Zhang, C., He, J., Yao, X., Mu, Y., Guo, X., Ding, X., Yu, Y., Shi, J., & Gao, H. (2020a). Dynamics of phytoplankton and nutrient uptake following dust additions in the north-west Pacific. *Science of The Total Environment*, 739, 139999.
- Zhang, M., Yu, Y., Yang, Z., & Kong, F. (2012). Photochemical responses of phytoplankton to rapid increasing-temperature process. *Phycological Research*, 60(3), 199–207.
- Zhang, T., Lu, X., Yu, R., Qin, M., Wei, C., & Hong, S. (2020b). Response of extracellular and intracellular alkaline phosphatase in *Microcystis aeruginosa* to organic phosphorus. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(34), 42304–42312.
- Zheng, L.-w., Zhai, W.-d., Wang, L.-f., & Huang, T. (2020). Improving the understanding of central Bohai Sea eutrophication based on wintertime dissolved inorganic nutrient budgets : Roles of north Yellow Sea water intrusion and atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, 267, 115626.
- Zhou, Y., Zhang, Y., Li, F., Tan, L., & Wang, J. (2017). Nutrients structure changes impact the competition and succession between diatom and dinoflagellate in the East China Sea. *Science of The Total Environment*, 574, 499–508.
- Zhu, Y., Ishizaka, J., Tripathy, S. C., Wang, S., Sukigara, C., Goes, J., Matsuno, T., & Suggett, D. J. (2017). Relationship between light, community composition and the electron requirement for carbon fixation in natural phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 580, 83–100.
- Zhu, Y., Suggett, D. J., Liu, C., He, J., Lin, L., Le, F., Ishizaka, J., Goes, J., & Hao, Q. (2019). Primary Productivity Dynamics in the Summer Arctic Ocean Confirms Broad Regulation of the Electron Requirement for Carbon Fixation by Light-Phytoplankton Community Interaction. *Frontiers in Marine Science*, 6.
- Zohary, T., Flaim, G., & Sommer, U. (2021). Temperature and the size of freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, 848(1), 143–155.

Table des figures

1	Cartographie des courants résiduels en baie de Seine (Orbi & Salomon, 1988).	19
2	Carte de la baie de Seine avec l'emplacement de la bouée SMILE.	20
3	Carte de l'estuaire de la Seine (GIP, https://www.seine-aval.fr/).	21
4	Schéma décrivant le processus d'eutrophisation anthropique et ses conséquences (Paerl, 2008).	25
5	Schéma du continuum de l'eutrophisation (Paerl et al., 2014).	26
6	Principales boucles de rétraction positive du changement climatique et de l'eutrophisation (Meerhoff et al., 2022).	27
7	Arbre phylogénétique représentant la distribution des taxons photosynthétiques eucaryotes (en couleur) (McGrath, 2020).	30
8	Schéma de l'évolution des plastes chez les eucaryotes, les endosymbioses sont représentées par des carrés gris. Les lignes colorées désignent les lignées des algues vertes (ligne verte) et des algues rouges (ligne rouge). L'endosymbiose primaire (en bas) a créée les trois lignées principales : algues rouges, vertes et glaucophytes (Keeling, 2010).	31
9	Représentation schématique des ordres de grandeur de taille des cellules de phytoplancton (Finkel et al., 2010).	33
10	Spectre absorption des pigments les plus usuels (Horton et al., 2005).	34
11	Organisation de l'appareil photosynthétique : <i>Chaetoceros sp.</i> (diatomée) (A), Chloroplaste de chlorobiontes (Taiz & Zeiger, 2010) (B), Disposition hétérogène des complexes sur la membrane des thylakoïdes (Allen & Forsberg, 2001) (C) Diagramme d'une unité photosynthétique (Garrett & Grisham, 2016) (D) Schéma représentant le transport des électrons à travers les photosystèmes de Huot & Babin (2010) modifié par Vivier (2021) (E).	39
12	Voies possibles d'un quantum de lumière absorbé par un pigment (P) (Garrett & Grisham, 2016) (Gauche), Diagramme énergétique des états d'excitation et des voies de dés-activation de la chl <i>a</i> (Droite) (Demers, 2011; Suggett et al., 2010).	40

13	<i>Package effect</i> : Schéma décrivant le mécanisme d'auto ombrage (Falkowski & Raven, 2007) (Gauche). Schéma de l'effet de la variation de la taille de cellule sur le mécanisme de ré-absorption et le ratio Fluorescence/photochimie (Droite).	43
14	Trajectoires historiques de l'Estuaire de Seine mesurées à Duclair (pK = 278) : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl <i>a</i> concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).	45
15	Trajectoires historiques de la Baie de Seine mesurées à Luc-sur-mer : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl <i>a</i> concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).	46
16	Dimension et échelle : Échelles spatiale et temporelle des processus marins (Dickey, 2003) (Gauche), Dimensions biologique et écologique de l'écologie du phytoplancton (Salmaso et al., 2015) (Droite).	47
17	Graphical Abstract	53
18	Location of the Bay of Seine (France), local rivers are illustrated by arrow with their name.	56
19	Cytograms obtained from Cytoclus 4 software of a bioassay sample analysed with the CytoSense. (A) Cytogram of Total red fluorescence (a.u.) vs. Total sideward scatter allowing identification of Picoeukaryotes and <i>Synechococcus</i> , Nanoeukaryotes and <i>L. chlorophorum</i> ., with pictures taken by the CytoSense : <i>L. chlorophorum</i> with TEP (left) and <i>L. chlorophorum</i> (right). (B) Cytogram of Total orange fluorescence (a.u) vs. Total forward scatter allowing identification of <i>Synechococcus</i> spp. and Cryptophytes.	60
20	Figure 3 : SMILE buoy temporal series : fluorescence (FFU) (A), dissolved O ₂ concentration (B), Temperature (C), Turbidity (D), Practical salinity (E), PAR (F). Dashed lines demarcate the bloom event, shadow areas show night period.	63
21	SMILE nutrient temporal series : NH ₃ concentration (A), NO ₃ ⁻ measured with WIZ sensor (colorimetry) (B), NO ₃ ⁻ measured with Opus probe (optic) (C), PO ₄ ³⁻ concentration (D), N:P ratio (E) dashed lines demarcate the bloom event.	64
22	SMILE buoy FRRf temporal series : The maximum quantum efficiency of PSII (A), maximal PSII electrons flux per unit volume (B), maximal electron transport rate per chl <i>a</i> unit (C). Dashed lines demarcate the bloom event, shadow areas show night period.	65
23	Bioessay experiment, nutrients concentrations : NO ₃ ⁻ concentration (A), PO ₄ ³⁻ concentration (B), Si(OH) ₄ concentration (C)	66

24	Figure 7 : Bioessay experiment, phytoplankton communities results : Chla concentration (A), <i>Synechococcus</i> concentration (B), Picoeukaryotes concentration (C), Nanoeukaryotes concentration (D), Cryptophytes concentration (E), <i>L. chlorophorum</i> concentration (F), normalised APA production (G), normalised TEP production (H).	68
25	Figure 8 : Bioessay experiment, photosynthetic parameter : The maximum quantum efficiency of PSII (A), maximal PSII flux per unit volume (B), maximal electron transport rate per chl a unit (C)	69
26	Bioessay experiment, FRRf σ_{PSII}	75
27	Graphical abstract.	81
28	Variation in different RUEs based on the N:P ratio. RUE _{NP} (dashed red) overlay RUE _P (blue) and RUE _N (green). The black dashed line displays the tipping point of the RUE _{NP} calculation where RUE _{NP} is equal to either RUE _N or RUE _P . RUE _N and RUE _P curves are inspired by a Holling type IV functional response. This figure is modified from Hodapp et al., (2019).	89
29	SMILE buoy temporal series : fluorescence (FFU) (A), temperature (°C) (B), NO ₃ ⁻ measured with Opus probe in black and by the SOMLIT national network in red (μmol.l ⁻¹) (C), PO ₄ ³⁻ concentration from SOMLIT national network (D). Coloured vertical dotted lines display the start of each numerated incubation.	90
30	Heatmap of normalized chl <i>a</i> measurement by enrichment and by incubation; values are nonnormalized. Grey values indicate lack of data (A). Relationship between phytoplankton growth Δchl <i>a</i> (μg.l ⁻¹) and the N:P _{consumed} ratio (a.u.), the green dots represent the 90 th percentile points, the dashed black line represents the mean 90 th percentile, and the red line represents the standard deviation (B). D ₀ indicate the value before incubation of the experiment.	91
31	Heatmap of normalized TEP measurement per enrichment and per incubation (A). Relationship between TEP _{chl a} and log N:P _{D0} . The vertical red line represents the Redfield ratio (N:P = 16), and the horizontal red line represents the polynomial regression with the 95 th confidence interval represented by a dashed black line (B). Heatmap of normalized APA measurement per enrichment and per incubation (C). Relationship of APA _{chl a} and log N:P _{D0} . The vertical red line represents the Redfield ratio (N:P = 16), and the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line (B).	93
32	Normalized phytoplankton communities and physiological state : maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) (A), <i>Synechococcus</i> concentration (B), Picoeukaryote concentration (C), Nanoeukaryote concentration (D), Cryptophytes concentration (E), Microphytoplankton concentration (F).	96

33	Multivariate analysis of the last 6 incubations : Principal component analysis (PCA) with a total of 66.3 % of variance expressed with the two (A), cluster plot. The optimal number of clusters was chosen using silhouette analysis (B), cluster dendrogram (C).	97
34	Relationship and regression of the log of RUENP and the log of phytoplankton class contribution : picoeukaryotes (%) (A), nanoeukaryotes (%) (B), microphytoplankton (%) (C).	98
35	Diagram of the experimental design.	101
36	Cytograms obtained from Cytoclus 4 (version 4.7.0.6) software of a bioassay sample analysed with CytoSense. (A) Cytogram of total red fluorescence (a.u.) vs. total forward scatter allowing identification of Picoeukaryotes and <i>Synechococcus</i> spp., Nanoeukaryotes and Microphytoplankton (B) Cytogram of total orange fluorescence (a.u.) vs. total forward scatter allowing identification of <i>Synechococcus</i> spp. and Cryptophytes.	102
37	Seine Estuary map : White point display sampling station with associated Kp value.	114
38	Estuary high frequency temporal data : River flow ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) (Top), Dissolved oxygen (mg.l^{-1}) (Bottom), colored dotted vertical lines display the date of each campaign.	119
39	Spatiotemporal environmental parameter patterns measured in the Seine estuary between March 2019 and July 2021 : Turbidity (NTU) (A), chl a concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$) (B), oxygen saturation (%) (C), Nitrate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (D), Silicate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (E), Phosphate ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (F), Kp (kilometre point).121	
40	Spatiotemporal structure patterns of phytoplankton communities measured by flow cytometry in the Seine estuary between June 2020 and July 2021 : Cryptophytes concentration (cells.cm^{-3}) (A), Picoeukaryotes concentration (cells.cm^{-3}) (B), Nanoeukaryotes concentration (cells.cm^{-3}) (C), Microphytoplankton concentration (cells.cm^{-3}) (D). Kp (kilometre point).	122
41	Spatiotemporal structure patterns of phytoplankton communities measured by multispectral fluorometer in the Seine estuary between July 2019 and July 2021 : Chlorophytes (%) (A), Chromophytes concentration (%) (B), Phycoerythrine group (%) (C), Phycocyanine group (%) (D). Kp (kilometre point).	123
42	Spatiotemporal patterns of photosynthetic parameters measured in the Seine estuary between July 2019 and July 2021 : Fv/Fm (A), α ($\mu\text{mol e}^- . \mu\text{mol photon}^{-1}$) (B), JVP _{II} max ($\text{mmol e}^- .\text{m}^{-3}.\text{h}^{-1}$) (C), ETR _{II} max ($\text{mmol e}^- .\text{mg chl a}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (C), JVP _{II} max and ETR _{II} max. values have been logged for visual display, unlogged value are display by the scale. Kp (kilometre point).	124

43	Multivariate analysis : Interstructure of the Partial Triadic Analysis (PTA) with a total of 41.4 % of variance expressed with the two axes (A), cluster plot, the optimal number of cluster was 2 we choose to display 3 to show more complexity (B)	124
44	Annual Phytoplankton Primary Production (PPP) ($\text{g C.m}^{-2}.\text{y}^{-1}$). estimated along the Seine estuary Kp (kilometre point)	125
45	Historical variations in the Seine estuary measured at Duclair (Kp = 278) : Nitrates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), Phosphates ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), N:P ratio, chl <i>a</i> concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$).	131
46	Spatiotemporal patterns of temperature ($^{\circ}\text{C}$) measured in the Seine estuary between March 2019 and July 2021.	133
47	Production and consumption : relationship between chl <i>a</i> production and the log N:P value (A). The horizontal solid red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line. Relationship between the log $N:P_{consummed}$ ratio and the log $N:P_{initial}$ (B). Relationship between RUE_{NP} and the production ($\text{JV}_{II\max}$) (C). Red vertical line indicates the redfield ratio (N:P = 16), square coloured point display barycentre of each enrichment group. . . .	143
48	Physiological response to dystrophy : relationship between APAchla and the log N:P value, (A). Relationship between the log TEP concentration and the log N:P value (B). Relationship between Fv/Fm and the log N:P value (C). Red vertical line indicate the redfield ratio (N:P = 16), the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.	144
49	Dystrophy effect on size structure : relationship between picophytoplankton (0-2 μm cells) and the and the log N:P value (A). Relationship between nanophytoplankton (2-20 μm cells) and the and the log N:P value (B). Relationship between microphytoplankton (>2 μm cells) and the log N:P value (C). the horizontal red line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed red line. . . .	145
50	Dystrophy effect on photosynthesis : relationship between production ($\text{JV}_{II\max}$) and the and the log N:P value (A). Relationship between productivity ($\text{ETR}_{II\max}$) and the and the log N:P value (B). Relationship between the carbon fixation requirement ($\Phi_{e,c}$) and the log N:P value (C). Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line.	146

51	RUE constraints : relationship between RUE_{Si} and the production ($JV_{II_{max}}$) (A). Relationship between RUE_P and the production ($JV_{II_{max}}$) (B). Relationship between RUE_N and the production ($JV_{II_{max}}$) (C). Relationship between RUE_{NP} and the production ($JV_{II_{max}}$) (D). Solid coloured line display linear regression.	154
52	Functionnal diversity : relationship between Pielou index based on cytometric groups and the log N:P value (A). Relationship between $\sigma_{452}/\sigma_{PSII}$ and the log N:P value (B). Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.	155
53	Light and dystrophy : Relationship between NPQ and the log N:P value (B). Relationship between E_K and the log N:P value (B). Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16), the horizontal solid black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line.	156
54	Relationship between the cross section functionnal absorption (σ_{PSII}) and the log N:P value. Red vertical line indicates the Redfield ratio (N:P = 16) the horizontal black line represents the polynomial regression, with the 95 % confidence interval represented by a dashed black line, square coloured point display barycentre of each enrichment group.	157
55	Photographie de la bouée SMILE lors d'une mission de maintenance (Gauche) Photographie du FRRf sur la bouée SMILE (Droite)	234
56	Méthodologie de la fluorimétrie variable : sous une faible lumière (LD) alors que l'activité photosynthétique est négligeable, la fluorescence émise est minimale (F_o). Lors du flash saturant (LS) le premier accepteur Q_a est réduit permettant de mesurer la fluorescence maximale (F_m). Des lumières actiniques croissantes ($LA_{1,2,3}$) vont ensuite être appliquées pendant 30 secondes entre chaque flash saturant (LS) (A) Courbe de saturation single-turnover (B) Courbe de production-Énergie (PE), les points rouges représentent les données réelles et la courbe noire le modèle utilisé pour estimer P_m et E_k (C).	240
57	Schéma du fonctionnement de la cytométrie en flux (Gauche). Schéma décrivant les profils optiques réalisés par le Cytosense (en haut à droite). Exemples de photographies prises par la caméra (en bas à droite)	244

Liste des tableaux

1	Table reasuming incubation. For fluorimeter type : FRRF stand for FRRf- ACT2 and STAF for LabSTAF Blank cases indicate lack of data, while “X” mean presence.	103
2	Table reasuming campaign, For fluorimeter type : FRRF stand for FRRf- ACT2 and STAF for LabSTAF Blank cases indicate lack of data, while “X” mean presence.	132
3	Enrichment concentration table. Concentration value are displayed in μmol^{-1}	149

Annexe A

Matériel & Méthodes

Site d'étude

Baie de Seine & Bouée SMILE

La baie de Seine se trouve au sud du bassin Est de la Manche. Cet écosystème côtier d'une surface d'environ 4000 km² est caractérisé par un marnage important, la baie a une profondeur maximale de 30 m. La baie de Seine est fortement influencée par les apports des fleuves. Parmi ces fleuves la Seine qui représente 85 % des apports d'eau douce de la Baie, on trouve aussi la Touques, l'Orne, la Vire, la Dives.

SMILE (Système de Mesures Instrumenté Littoral pour l'Environnement) est une bouée de mesure haute fréquence temporelle située au large de Luc sur mer (49°21'14 N - 0°19'41 W) dans une zone permettant à la fois la mesure de deux masses d'eau distinctes, donnant ainsi une information plus complète sur la baie de Seine, qui est sous l'influence des apports du fleuve principal, la Seine et d'un plus petit fleuve l'Orne. C'est donc un point important pour l'appréhension de l'effet du gradient eutrophique en baie de Seine.



FIGURE 55 – Photographie de la bouée SMILE lors d'une mission de maintenance (Gauche) Photographie du FRRf sur la bouée SMILE (Droite)

La bouée SMILE est équipée de multiples capteurs permettant de mesurer : la conductivité et la température (tetracon sensor, WTWTM, Allemagne), la turbidité (seapoint turbidity meter, États-Unis), l'oxygène dissous (AADI Oxygen optode, Aanderraa, Norvège), la fluorescence (Cyclops-6K, Turner Design, États-Unis) en fluorescence par unité de fluorescéine (FFU). Ces paramètres sont regroupés dans une sonde multiparamètre NKE

(MP7, NKE Instrumentation, France). Le PAR a été mesuré avec un capteur Satlantics (Satlantics, Italie). Un capteur optique l'OPUS (Trios, Allemagne) permet la mesure haute fréquence des nitrates. Ces paramètres sont mesurés à une fréquence de 20 minutes. En plus de l'OPUS le capteur WIZ (SYSTEAS S.p.A, Italie) permet la mesure de nitrates mais aussi phosphates et ammonium à une fréquence de mesure plus basse (12 h).

Le capteur WIZ utilise la technique de *micro loop flow analysis* (μ LFA) pour la mesure autonome de 4 sels nutritifs : NO_3^- , PO_4^{3-} , NO_2^- par mesure colorimétrique et NH_3 par méthode fluorimétrique (Azzaro, 2014; Moschetta et al., 2009). Pour cet instruments de mesure les limites de détections correspondent à $0.35 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour NO_3^- , et $9.2.10^{-2} \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour PO_4^{3-} et NO_3^- .

NO_3^- est aussi mesuré à l'aide d'un capteur optique (OPUS, Trios, Germany). L'OPUS UV est un capteur spectral équipé d'une lampe xénon comme source de lumière et possédant comme détecteur un spectromètre miniature (MMS, Zeiss, Germany) équipé de 256 canaux couvrant les longueur d'ondes de 200 à 360 nm. Cette mesure est réalisée à haute fréquence à bas coûts énergétique. Le capteur peut mesurer une gamme allant de 1 à $357 \mu\text{mol.l}^{-1}$ avec une précision de $0,18 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Campagne en estuaire de Seine

L'estuaire de Seine s'étend sur une distance de 170 km de Poses à son embouchure. Le point kilométrique (Pk) représentant la distance d'un point sur l'estuaire à Paris en suivant le cours du fleuve est habituellement utilisé pour localiser un point le long du fleuve. L'estuaire peut se décomposer en fonction de la salinité entre Poses (Pk : 200) et Vieux-port (Pk : 325), c'est l'estuaire fluvial, entre Vieux-port et Honfleur (Pk : 360) c'est la zone de mélange des eaux douces et marines et qui correspond à la zone maximale de turbidité, après Honfleur, c'est l'estuaire marin. Les campagnes en Estuaire de Seine consistent à remonter l'estuaire de Honfleur ($49^\circ 25' 45''$ N $0^\circ 13' 50.00''$ E- Pk : 355) jusqu'à Rouen ($49^\circ 26' 33''$ N $1^\circ 4' 15.00''$ – Pk : 246) représentant un transect de 110 km environ.

Afin de suivre l'évolution spatiale d'une même masse d'eau, les campagnes de transect étaient programmées pour suivre la marée montante avec un coefficient de marée variant de 51 à 96 (moyenne = 80). Une pompe à diaphragme (UF0812 – Whale[®], RU) a été utilisée en continu au cours des transects afin de prélever de l'eau. Plusieurs paramètres ont été mesurés à haute fréquence (au maximum 8 minutes d'intervalles) : température, salinité, turbidité et l'oxygène dissous avec une sonde multiparamètre YSI 6600 (YSI, États-Unis), le PAR (RBR solo³ PAR), les nitrates avec l'OPUS (TriOS Mess & Datentechnik GmbH, Allemagne), la fluorescence multispectrale avec une fluoroprobe (BBE -

Moldaenke, Allemagne) et les paramètres photosynthétiques avec un fluorimètre single-turnover (FRRf or Labstaf Chelsea Technologies, RU). Sur 12 stations définies le long du transect des prélèvements à basse fréquence sont effectués en plus : chl *a*, sels nutritifs inorganique, activité de la phosphatase alcaline (APA), et structure de la communauté phytoplanctonique par des mesures de cytométrie en flux.

Mesure en laboratoire

Mesure de la chlorophylle *a*

Pour la mesure des concentrations en chl *a*, des échantillons d'eau de volume variable (en fonction de la turbidité) sont filtrés avec un filtre Whatman, GF/F 47 mm, 0.7 µm en fibre de verre puis congelé (-20 °C) jusqu'au moment de l'analyse. Pour extraire les pigments 10 ml d'acétone à 90 % (v/v) au filtre puis laissés au noir à 4 °C pendant 12 h. Après cette période, les échantillons sont centrifugés deux fois à 1700 g pendant 5 minutes. La concentration en chl *a* extraite est mesurée avec un fluorimètre Turner Designs (Sunnyvale, EU) selon la méthode de Strickland & Parsons (1972).

Activité de la phosphatase alcaline (APA)

L'activité de la phosphatase alcaline par unité de chl *a* a été mesurée selon Hrustic et al. (2017). Les échantillons (3920 µl) sont placés dans une cuvette UV avant que 80 µl de substrat (500 µM) soit ajouté 4-methylumbelliferyl phosphatase (MUF-P). Pendant qu'ils incubent à température de la pièce, les échantillons sont mesurés toutes les heures sur une période de plusieurs heures (5 - 7 h). Un spectrophotofluorimètre RF-6000 (Shimadzu, Japon) a été utilisé pour les mesures (Ex : 359, Em : 449). L'APA a été calculé comme étant le coefficient correcteur de la régression linéaire de la courbe mesurée au cours du temps. Pour le standard du 4-methylumbelliferyl conservé dans 2-Methoxyethanol a été utilisé. l'APA est exprimé en concentration par unité de temps par unité de chl *a* pour normaliser les échantillons en fonction de la biomasse : $APA_{chl a} (nM.h^{-1}.µg chl a^{-1}.l^{-1})$

Particules exopolymériques transparentes (TEP)

Pour la mesure des TEP, les échantillons d'eau sont filtrés avec un filtre Millipore 0.4 µm en polycarbonate puis congelés (-20 °C) jusqu'à l'analyse. Selon Claquin et al. (2008) adapté de Passow & Alldredge (1996), les filtres sont colorés avec une solution de bleu d'Alcian (0.02%) avec 0.06 % d'acide acétique (pH : 2.5). L'excès de bleu d'Alcian est rincé en ajoutant de l'eau puis passant le filtre à la centrifugeuse (3000 g, 19 °C, 15 min). Ce cycle de rinçage est répété deux fois puis 6 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 80% sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation, les mesures sont prises avec un spectrophotomètre

(Pharmacia Biotech Ultraspec 1000 Spectrophotometer) à 787 nm. La droite de calibration est mesurée en utilisant de la gomme xanthane (10 - 700 µg) comme standard. Pour normaliser les concentrations en TEP, les valeurs mesurées sont divisées par la chl *a* ($TEP_{chl a}$) et exprimées en µg.Xanthane eq.µg chl *a*⁻¹.

Mesures des sels nutritifs inorganiques (NO_3^- , PO_4^{3-} , Si(OH)_4)

Pour la mesure de sels nutritifs, les échantillons d'eau sont filtrés à travers un filtre en acétate de cellulose (ClearLine, CA, 33 mm, 0.45 µm) puis congelés (-20 °C) pour les nitrates et les phosphates, ou placés à -3 °C pour les silicates. Les analyses ont été réalisées avec un système d'auto analyseur SEAL Analytical AA3 system (Strickland & Parsons, 1972). Les limites de détections sont de 0.02 µmol.l⁻¹ pour le PO_4^{3-} de 0.05 µmol.l⁻¹ pour les NO_3^- , NO_2^- et Si(OH)_4 . Le rapport N:P a été calculé comme étant $\text{NO}_3^- / \text{PO}_4^{3-}$.

Efficacité d'utilisation de la ressource (RUE)

L'efficacité d'utilisation de la ressource représente la quantité de biomasse produite par unité de ressource (Hodapp et al., 2019). L'équation de Ptacnik et al. (2008) permettant de calculer la RUE (chl *a*/P total) est simple, utilisant le P total comme facteur limitant. Cette méthode est la plus utilisée pour les calculs dans la littérature (Chai et al., 2020; Filstrup et al., 2019; Lehtinen et al., 2017; Yang et al., 2021). D'autres versions de cette méthode existent en utilisant d'autres paramètres comme unité de ressource comme le N (Amorim & Moura, 2021; Frank et al., 2020; Olli et al., 2015; Otero et al., 2020). La part inorganique des sels nutritifs (DIN et DIP) peut aussi être employée (Amorim & Moura, 2021; Otero et al., 2020). Cependant il y a un besoin de considérer la problématique de stoechiométrie lors des calculs de RUE (Frank et al., 2020).

Dans l'hypothèse d'une co-limitation (Arrigo, 2005; Saito et al., 2008) le calcul nécessite donc de prendre en compte plus d'un sels nutritifs. En se basant sur le concept de co-limitation par alternance entre le N et le P décrit par Davidson & Howarth (2007) et Elser et al. (2007), en fonction de l'équilibre le N et le P pourrait limiter la croissance l'un après l'autre jusqu'à ce qu'une des concentrations soit trop faible pour permettre la consommation. Dans ce schéma le sels nutritifs présent dans les plus faibles proportion sera le dernier limitant. Pour pouvoir comparer le N et le P dont les concentrations présentent une proportion différent il faut appliquer un facteur de correction. La manière la plus simple d'avoir ce facteur est de prendre le ratio équilibré N:P de Redfield (Falkowski, 2000; Lips & Lips, 2008) bien qu'il peut être discuté dans le cas des écosystèmes à fortes pressions anthropiques (Arrigo, 2005; Chorus & Spijkerman, 2020; Glibert & Burkholder,

2011). Si le rapport N:P est supérieur à 16 on va considérer que le système est limité par le P, s'il est inférieur à 16 il sera limité en N.

En se basant sur l'équation de Ptacnik et al. (2008), l'efficacité de la ressource pour système co-limité (RUE_{NP}) peut être calculée :

$$RUE_{NP} = \frac{chl\ a}{\min\left\{\frac{N}{N/P_{ratio\ équilibré}}, P\right\}} \quad (41)$$

Avec $N:P_{ratio\ équilibré}$ correspondant à 16 selon Redfield (1958). Si $N:P > N:P_{ratio\ équilibré}$ alors RUE_{NP} correspond à RUE_P , dans l'autre cas ou $N:P < N:P_{ratio\ équilibré}$ alors RUE_{NP} correspond à RUE_N . Ce calcul permet d'éviter des surestimations de la RUE dans les cas de dystrophie associés au systèmes co-limités. Par exemple, dans un contexte de très haut N:P (> 300), le calcul de RUE_N serait réduit du à la présence excessive de N, alors que le paramètre limitant ici est le P, dans ce cas RUE_P serait bien plus adaptée. Le calcul de RUE_{NP} permet de couvrir les cas de dystrophie.

Paramètres photosynthétiques

L'estimation de paramètres photosynthétiques via la fluorimétrie variable a été réalisée en utilisant trois instruments : un water PAM (Walz, Allemagne) qui produit une saturation du PSII en "multi turnover (MT)", et deux autres fluorimètres qui induisent une saturation en "single-turnover (ST)" au Frrf-ACT2 (Chelsea technologies, RU) et un LabSTAF (Chelsea technologies, RU). Ces méthodes diffèrent du point de vue de la saturation des PSII, dans le cas du multi-turnover, l'excitation lumineuse est assez longue pour que le cycle d'ouverture et de fermeture des centres réactionnels se fassent plusieurs fois réduisant les plastoquinones, les quinones A vont donc donc subir plusieurs cycles de réduction et d'oxydation. Dans le cas du single-turnover, le flash lumineux est plus court et les centres réactionnels n'ont pas le temps de se rouvrir. Avant chaque mesure, les échantillons sont placés au noir permettant ainsi une oxydation des quinones A et une ouverture de la plupart des centres réactionnels. Pour le water-PAM, l'échantillon est excité par une lumière de faible intensité dans le bleu ne permettant pas le transfert d'électrons ($1\ \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 470 nm, 0.6 kHz de fréquence) pour mesurer la fluorescence minimale après mise au noir (F_o). La mesure de la fluorescence maximale après mise au noir (F_m) est ensuite obtenue durant un flash saturant multi turnover ($0.6\ \text{s}$, $1700\ \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), qui permet de réduire les quinones A. Pour le FRRf, une saturation single-turnover est induite par la succession de 100 flashes de 1 μs chacun espacé

d'un intervalle de 2 μs (452 nm) pour mesurer la fluorescence minimale (F_o) et maximale (F_m) comme indiqué par le modèle de Kolber et al. (1988). Pour le labSTAF, une saturation single-turnover est induite par un flash plein de 100 μs (450 nm) pour mesurer la fluorescence maximale et minimale comme décrit dans Boatman et al. (2019). De plus, dans le cas des méthodes single-turnover, il est possible d'estimer des paramètres supplémentaires : le coefficient directeur de la pente de saturation de F_o à F_m permet d'estimer σ_{PSII} , la section efficace d'absorption fonctionnelle du PSII qui représente le produit de la capacité d'absorption des pigments et de l'efficacité de transfert du centre de réaction (Kolber & Falkowski, 1993), ainsi que la pente de la phase de désexcitation correspond à τ (Fig 56)

Le rendement quantique maximum d'efficacité du PSII, c'est à dire la quantité d'électrons de produit/absorbée par quanta de photon est calculée selon Genty et al. (1989) comme étant :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m} \quad (42)$$

La succession de flashes saturant à des intensités de PAR de plus en plus fortes permet de mesurer les variations des paramètres photosynthétiques en fonction de l'intensité lumineuse. En pratique, chaque phase dure 30 s à une intensité donnée permettant de mesurer la fluorescence stable F_s et maximale (F_m'), le rendement quantique se calcule alors comme étant :

$$\frac{F'_q}{F'_m} = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} \quad (43)$$

On peut donc ensuite estimer le taux de transfert d'électrons (rETR) relatif comme étant :

$$rETR(E) = \frac{F'_q}{F'_m} \cdot E \quad (44)$$

Les variations de ce taux relatif de transport d'électrons en fonction de la lumière correspondent à des courbes de Production-Énergie (abrégé courbe PE). La modélisation de ces données formant alors une courbe, permet d'obtenir des paramètres supplémentaires. De nombreux modèles existent pour la modélisation des courbes PE (Silsbe & Kromkamp, 2012) , dans cette thèse nous avons principalement utilisé le modèle de Webb et al. (1974) (Equation 45) ainsi qu'une amélioration de ce modèle comprenant des paramètres sur la photoinhibition (Boatman et al., 2019) (Equation 46) :

$$rETR(E) = \alpha \cdot E_k \cdot (1 - e^{\frac{-E}{E_k}}) \quad (45)$$

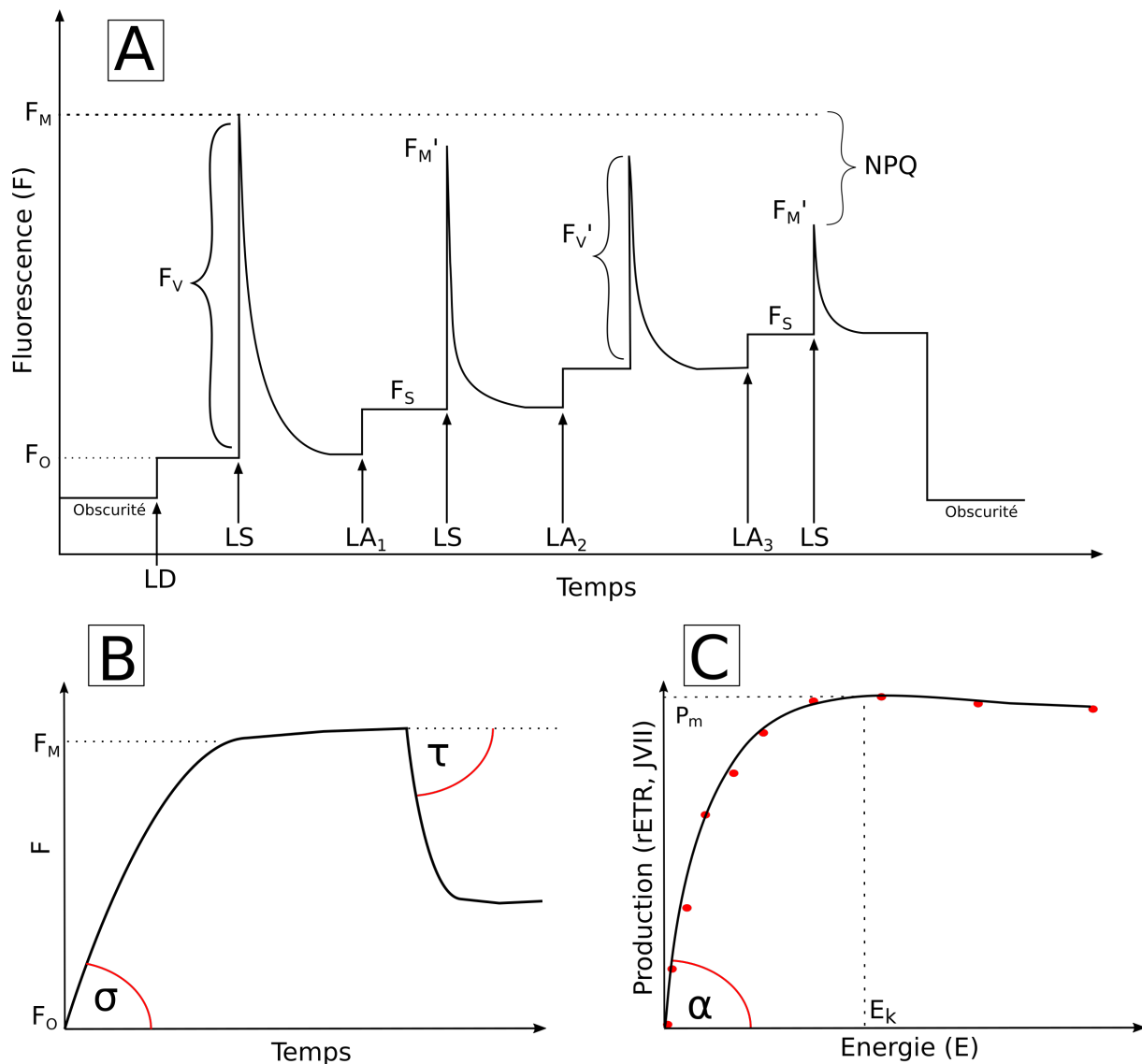


FIGURE 56 – Méthodologie de la fluorimétrie variable : sous une faible lumière (LD) alors que l'activité photosynthétique est négligeable, la fluorescence émise est minimale (F_0). Lors du flash saturant (LS) le premier accepteur Q_a est réduit permettant de mesurer la fluorescence maximale (F_m). Des lumières actiniques croissantes ($LA_{1,2,3}$) vont ensuite être appliquées pendant 30 secondes entre chaque flash saturant (LS) (A) Courbe de saturation single-turnover (B) Courbe de production-Énergie (PE), les points rouges représentent les données réelles et la courbe noire le modèle utilisé pour estimer P_m et E_k (C).

$$rETR(E) = \alpha \cdot E_k \cdot \left(1 - e^{\frac{-E}{E_k}}\right) - \beta \cdot E_{k\beta} \cdot \left(1 - e^{\frac{-(E-E_k)}{E_{k\beta}}}\right) \quad (46)$$

De la modélisation des courbes PE, on peut donc estimer au moins deux paramètres : α et E_k , permettant ainsi de calculer le taux de transport maximal d'électrons ($rETR_{max}$) du PSII :

$$rETR_{max} = \alpha \cdot E_k \quad (47)$$

Afin de calculer un taux de transport des électrons (ETR) absolu, l'algorithme d'absorption (Oxborough et al., 2012) peut être utilisé pour estimer a_{LHII} (m^{-1}) le coefficient d'absorption des antennes collectrices avec K_c une constante dépendant de l'instrument :

$$a_{LHII} = \frac{F_m \cdot F_o}{F_m - F_o} \cdot K_c \quad (48)$$

$$JV_{PSII}(E) = a_{LHII} \cdot rETR(E) \cdot 3600 \cdot 10^{-6} \quad (49)$$

Le JV_{PSII} ($mmol\ e^- \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$) représente le flux d'électron du PSII par volume et par unités de temps. La productivité ($mmol\ e^- \cdot m^{-3} \cdot h^{-1} \cdot \mu g\ chl\ a^{-1}$), c'est à dire la production par unité de biomasse, peut donc être calculée ainsi :

$$ETR_{PSII}(E) = JV_{PSII} \cdot [chla]^{-1} \quad (50)$$

Pour obtenir une productivité en carbone il faut diviser la productivité par $\phi_{e,c}$ définissant le nombre de moles d'électrons requis pour fixer une mole de carbone ($mol\ e^- \cdot mol\ carbone^{-1}$) :

$$P = ETR_{PSII}(E) / \phi_{e,c} \quad (51)$$

Incubation ^{13}C

Des expériences d'incubations avec du ^{13}C ont été réalisées au cours des années 2019 et 2020 pour estimer la production primaire (données non présentes dans la thèse) et durant les expériences d'incubations du chapitre 5 en reprenant les protocoles appliqués par Morelle & Claquin (2018); Napoléon & Claquin (2012). Un échantillon est placé dans des flasques de 265 ml pour les prélèvements en baie et de 62 ml pour les expériences sur les rapports stoechiométriques puis un enrichissement avec du $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (98 atom %, Sigma), correspondant à 15 % du carbone inorganique présent dans de l'eau de mer, est réalisé. Les flasques enrichies sont ensuite placées dans un photosynthétron (Babin et al., 1994) possédant un système de régulation de température (Napoléon & Claquin, 2012). L'intensité lumineuse et le spectre lumineux sont contrôlés avec un SpectraPen mini (Photo Systems instruments, Rep. Tchèque). Dans le cas des incubations les flasques sont placées à une intensité correspondant au E_k mesuré plus tôt sur les échantillons.

Après 3 h d'incubations, les flasques sont filtrées sur filtre Whatman GF/F qui sont conservés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Pour enlever les carbonates les filtres sont exposés pendant 4 h à de l'HCl (37 %) puis séchés à l'étuve (50 %) pendant 12 h. La concentration en carbone organique particulaire (COP) et le ratio isotopique de ^{13}C et ^{12}C ont été déterminés par la plateforme PLATIN de l'US EMERODE de l'UniCaen à l'aide d'un analyseur élémentaire (EA 3000, Eurovector) couplé à un spectromètre de masse (IsoPrime, Elementar). Le taux de fixation de carbone (Pobs) a été calculé selon la méthode de Hama et al. (1983). La valeur de l'incorporation de carbone au noir a été soustraite à l'ensemble des données et P^c a été exprimé en $\mu\text{mol C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet la mesure et le comptage à grande vitesse de particules contenues dans un liquide. Le principe de base est celui de la diffraction laser aussi utilisé en granulométrie : une particule devant le faisceau de lumière d'un laser va la diffracter selon sa taille et sa forme. En plus de cela, la cytométrie va utiliser la fluorescence naturelle (autofluorescence) et/ou la fluorescence induite par des marqueurs (fluorochrome) pour distinguer des cellules du reste. Les cellules du phytoplancton contiennent des pigments capable de fluorescence comme la chl *a* si excités à la bonne longueur d'onde, ce qui rend cette technique adaptée à l'étude de ce compartiment biologique.

En pratique, un échantillon d'eau contenant des cellules du phytoplancton va être prélevé via une pompe puis un liquide de gaine va permettre de conserver un flux laminaire faisant passer les cellules séparées une à une devant le laser. En passant devant le laser, le faisceau de lumière diffracté par la cellule va être récupéré par des photomultiplicateurs (PMT) à deux angles : 15° pour le forward scatter (FWS) et 90° pour le sideward scatter (SWS). Ces paramètres vont servir d'indicateurs de taille et de forme pour des cellules. Un laser de couleur bleu va permettre l'excitation de la chl *a* contenue dans les cellules, la fluorescence mesurée va ensuite passer dans plusieurs filtres permettant de récupérer la fluorescence rouge (FLR), orange (FLO) et jaune (FLY). Afin de mesurer la taille des cellules, on peut ensuite convertir les valeurs de FWS et SWS en μm en se servant d'étalons : des billes peuvent être utilisées de différents diamètres afin de produire des régressions diamètre particule/diamètre cellule, de la même manière des cultures de phytoplanctons de taille connues peuvent être utilisées pour la calibration.

Le Cytosense (Cytobuoy, Pays-bas) est un cytomètre automatisé spécialement conçu dans le but d'étudier le phytoplancton. Ce cytomètre permet de mesurer des cellules de 1 à 1000 μm et est équipé de deux lasers : un bleu (452 nm, 50 mW) et un vert (552 nm, 50 mW). Grâce à un double faisceau laser, il est capable de mesurer des profils optiques de chaque cellule permettant d'obtenir des informations supplémentaires et de distinguer les chaînes de cellules par exemple. Aussi, une caméra permet de prendre des photos des particules en fonctions d'optiques caractéristiques désirées permettant sur les plus grosses cellules de déterminer le genre voire l'espèce. Pour l'estimation de la taille des particules, des billes fluorescente de 1, 1,5, 2, 5, 10 et 20 μm ont été utilisées au cours de la thèse.

La détermination des groupes de la structure de communauté du phytoplancton peut se faire de plusieurs manières. Pour commencer les particules autotrophes sont séparées du reste des particules grâce au signal de FLR. Des groupes peuvent être séparés en fonction de classe de taille, la classification de Sieburth et al. (1978) est habituellement utilisée séparant en trois catégories : le picophytoplancton ($<2\ \mu\text{m}$), le nanophytoplancton ($2\text{-}20\ \mu\text{m}$) et le microphytoplancton ($>20\ \mu\text{m}$).

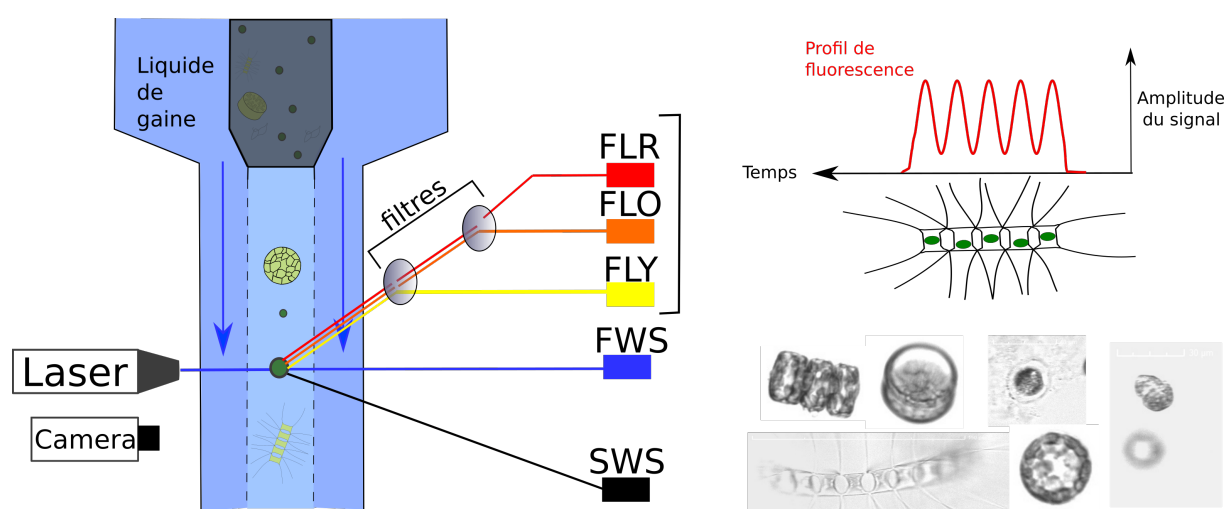


FIGURE 57 – Schéma du fonctionnement de la cytométrie en flux (Gauche). Schéma décrivant les profils optiques réalisés par le Cytosense (en haut à droite). Exemples de photographies prises par la caméra (en bas à droite)

Annexe B

Publication

Le chapitre 2 à fait l'objet d'une publication dans Marine Pollution Bulletin
DOI : 10.1016/j.marpolbul.2021.112387



Marine Pollution Bulletin

Volume 168, July 2021, 112387



Coupling high frequency monitoring and bioassay experiments to investigate a harmful algal bloom in the Bay of Seine (French-English Channel)

Léon Serre-Fredj ^{a, b}, Franck Jacqueline ^c, Maxime Navon ^{a, b}, Guillaume Izabel ^{a, d}, Léo Chasselin ^{a, d},
Orianne Jolly ^{a, d}, Michel Repecaud ^e, Pascal Claquin ^{a, b}  

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112387>

[Get rights and content](#)

Le chapitre 3 à fait l'objet d'une publication dans Journal of Environmental
Management

DOI : 10.1016/j.jenvman.2022.114487



Journal of Environmental Management

Volume 306, 15 March 2022, 114487



Colimitation assessment of phytoplankton growth using a resource use efficiency approach in the Bay of Seine (French-English Channel)

Léon Serre-Fredj ^{a, b}, Léo Chasselin ^{a, c}, Orianne Jolly ^{a, c}, Franck Jacqueline ^d, Pascal Claquin ^{a, b}  

[Show more](#) 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114487>

[Get rights and content](#)

Production primaire et dynamique phytoplanctonique le long d'un gradient d'eutrophisation : Continuum Estuaire - Baie de Seine.

Résumé :

Depuis les années 2000, sur le continuum Estuaire - Baie de la Seine les apports en phosphores (P) ont été réduit contrairement à ceux en azote (N) qui sont restés élevés. Cette réduction entraîne donc un déséquilibre de la stoechiométrie $N:P$ affectant les communautés phytoplanctoniques. L'écart à l'équilibre optimal de Redfield ($N:P = 16$) est appelé dystrophie. Pour qualifier et quantifier l'effet de la dystrophie sur le phytoplancton les méthodes de fluorimétrie variable et de cytométrie en flux sont employées pour étudier les production primaire, la structure des communautés et leurs interactions. Dans l'estuaire, au-delà de la limitation en lumière les communautés phytoplanctoniques sont affectées par la distribution des sels nutritifs, les déséquilibres $N:Si$ et $P:Si$ provoquent la succession des communautés. Une dynamique complexe de la production primaire a également été mise en évidence avec un rôle important du temps de résidence mais également l'influence de certains facteurs encore mal identifiés. Les expériences en milieux contrôlés et l'étude d'une efflorescence dans la baie montrent que la baie est co-limitée par le N et le P en fonction du rapport $N:P$, rendant nécessaire l'établissement d'un nouveau calcul "d'efficacité d'utilisation de la ressource (RUE)" adapté à la dystrophie, le RUE_{NP} . La dystrophie va affecter négativement les paramètres photosynthétiques et la production primaire, et accroître des indicateurs de stress physiologiques [activité de la phosphatase alcaline et les excréments de carbone (TEP)]. Cette dystrophie influence aussi la structure des communautés en entraînant une baisse de la diversité fonctionnelle et modification de la taille des communautés. La prise en compte de l'effet de la dystrophie sur le phytoplancton associé à celui du changement climatique est ainsi essentiel pour la gestion des écosystèmes côtiers et la scénarisation de trajectoires dans le continuum dans un contexte de gestion de l'eau est donc majeure.

Mots clés : Phytoplancton, stoechiométrie, eutrophisation, structure de communauté, photosynthèse, écophysologie

Primary production and phytoplankton dynamic along an eutrophication gradient : Seine bay - estuary continuum

Abstract :

In the Seine estuary - bay continuum since the 2000s, the input of phosphorus (P) have been reduced unlike the input of nitrogen (N) whose levels remained high. This reduction has led to an unbalanced $N:P$ stoichiometry affecting phytoplankton. The deviation from the optimal Redfield balance ($N:P = 16$) is called dystrophy. In order to quantify and qualify the effect of dystrophy, variable fluorimetry and flow cytometry are used to study the photosynthetic capacity and community structure of phytoplankton. Campaigns in the estuary have highlighted the light access as the main control factor of primary production. In the estuary, beyond the light limitation, phytoplankton communities are affected by nutrients distribution, as $N:Si$ and $P:Si$ unbalance trigger the communities succession. A complex primary production dynamic has also been highlighted with an important role of residence time but also the influence of other poorly identified factors. Incubation experiment and the study of a bloom display a N and P co-limitation in the bay based on the ratio $N:P$, making it necessary to use a dystrophy adapted calculation of resource use efficiency (RUE) : the RUE_{NP} . The dystrophy affects negatively photosynthetic capacity and the primary production and increases the physiological stress indicator (alkaline phosphatase activity and transparent exopolymeric particles). Moreover, the dystrophy affects communities structure leading to a decrease in functional diversity and modification of size structure. Eventually, dystrophy effect on phytoplankton associated to global change must be accounted in a context of management of the ecosystem and projection of trajectories in the continuum.

Key words : Phytoplankton, stoichiometry, eutrophication, community structure, photosynthesis, eco-physiology