

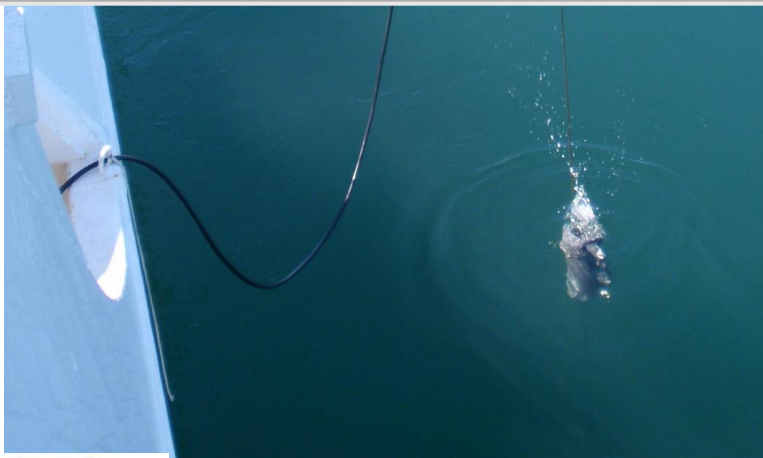


PHRESQUES – Phase 1

Harmonisation

Livrable IV.1.1.b

# Utilisation et étude des performances du spectrofluorimètre multi-spectral FluoroProbe (bbe Moldaenke)



CENTRE DE RECHERCHES  
EN ENVIRONNEMENT CÔTIER  
STATION MARINE

UNIVERSITÉ DE CAEN - NORMANDIE

Melanie Giraud & Pascal Clauquin

CREC – Station Marine – UMR BOREA

Université de Caen Normandie

Mars 2018

# Utilisation et étude des performances du spectrofluorimètre multi-spectral FluoroProbe (bbe Moldaenke)

## Résumé

Le spectrofluorimètre multi-spectral FluoroProbe (bbe Moldaenke) a été choisi dans le cadre du projet PHRESQUES afin de suivre la dynamique de la biomasse et de la distribution des communautés phytoplanctoniques au niveau de différents sites du continuum bassin versant-estuaire-baie de Seine. Ce travail évalue les résultats produits, l'effet de la turbidité sur les mesures et propose des recommandations d'utilisation et de paramétrage.

Les performances du FluoroProbe ont été étudiées de façon complémentaire sur des monocultures de phytoplancton en laboratoire et lors de campagnes sur le terrain en conditions *in situ*. Les expérimentations en laboratoire ont permis de mettre en évidence que par rapport à des méthodes traditionnelles le FluoroProbe n'était pas en mesure de fournir une estimation juste de la biomasse phytoplanctonique (en concentration en chlorophylle *a*). En effet, cette dernière est en générale surestimée par la sonde. Le FluoroProbe permet néanmoins d'observer l'évolution de la biomasse phytoplanctonique et donc de détecter par exemple des périodes de bloom et la dynamique générale des communautés. Les mesures réalisées en laboratoire avec différentes concentrations de MES montrent que l'augmentation de la turbidité affecte de manière variée les résultats en fonction des espèces testées mais ne remet pas en cause l'utilisation de ce capteur dans les eaux turbides.

Concernant la distribution du phytoplancton, la matrice de signatures de fluorescence spectrale fournie par le constructeur a été adaptée aux futurs sites d'implantation des sondes à partir d'espèces phytoplanctoniques recensées comme majoritaires dans la zone d'étude. Cette nouvelle matrice a permis de réduire la fraction de chlorophytes identifiée à tort par le FluoroProbe.

Les mesures *in situ* réalisées lors des campagnes de terrain ont mis en évidence un biais dans les mesures du FluoroProbe lié au quenching photochimique. Il faudra veiller à réduire le plus possible l'exposition de l'instrument aux rayonnements solaires dans son installation sur le site d'étude et définir une fréquence de mesure suffisamment importante pour réduire au maximum ce phénomène. Suivant ces préconisations et en utilisant les nouvelles matrices de signatures de fluorescence spectrale le FluoroProbe devrait permettre de suivre la dynamique de la biomasse et la composition des groupes pigmentaires du phytoplancton aux sites d'implantation sélectionnés.

# Sommaire

1. Vérification des performances du FluoroProbe en laboratoire .....	9
1.1. Identification et mise en culture des souches de travail.....	9
1.2. Estimation de la concentration en chlorophylle a.....	10
1.3. Distribution de la concentration en chlorophylle a entre les 4 groupes phytoplanctoniques ...	17
1.3.1. Tests en laboratoire avec les Signatures Spectrales de Fluorescence calibrées en usine ..	17
1.3.2. Définition de nouvelles Signatures Spectrales de Fluorescence .....	21
1.4. Effet de la turbidité sur les performances du fluoroprobe .....	28
1.4.1. Effet de la turbidité sur l'estimation de la concentration en chlorophylle a .....	28
1.4.2. Effet de la turbidité sur la distribution de la concentration en chlorophylle a entre les 4 groupes phytoplanctoniques.....	29
2. Mesures <i>in situ</i> avec le FluoroProbe pendant les campagnes PHRESQUES.....	31
2.1. Campagnes PHRESQUES.....	31
2.2. Mesures de surface haute-fréquences.....	32
2.3. Instabilité du FluoroProbe dans l'estimation de la chlorophylle a en haute-fréquence.....	33
2.3.1. Estimation de la chlorophylle <i>a</i> totale.....	33
2.3.2. Distribution des groupes phytoplanctoniques .....	36
2.4. Comparaison des données de FluoroProbe avec celles de l'AOA et de fluorimétrie .....	39
2.5. Recalcul des données de campagne avec une nouvelle matrice de Signatures de fluorescence spectrale .....	40
3. Conclusion .....	42
ANNEXE A : Préparation des milieux de culture.....	43
ANNEXE B : Procédure d'étalonnage du FluoroProbe avec de l'eau de mer filtrée et de l'eau distillée....	49
ANNEXE C : Procédure d'utilisation du FluoroProbe en laboratoire avec sa station de travail « Workstation 25 »	50
ANNEXE D : Procédure d'utilisation du FluoroProbe en condition <i>in situ</i> . .....	53

## Liste des figures

Figure 1:Photo du FluoroProbe sur la station de travail avec sa cuve en quartz de 25 mL. ....	11
Figure 2 : Visualisation avec le logiciel bbe ++ de la concentration en chlorophylle a totale (en éq µg/L de Chl a) et de la fraction pour chaque groupe phytolanc tonique en fonction du temps pour une culture de <i>Skeletonema sp.</i> laissée à la lumière avant la mesure.....	12
Figure 3 : Visualisation avec le logiciel bbe ++ de la concentration en chlorophylle a totale (en éq µg/L de Chl a) et de la fraction pour chaque groupe phytolanc tonique en fonction du temps pour une culture de <i>Skeletonema sp.</i> mise à l'obscurité 20 minutes avant. ....	13
Figure 4 : Comparaison des concentrations en Chl a mesurées sur des cultures de phytoplancton par fluorimétrie (Chl a extraite en µg/L) avec celles mesurées avec le FluoroProbe (Chl a <i>in vivo</i> en éq µg/L de Chl a) pour les groupes a) Chromophytes b) Chlorophytes.....	15
Figure 5 : Concentration en Chl a estimé avec le FluoroProbe (en éq µg.L-1 de Chl a) pour une gamme de concentration en fluorescéine. ....	16
Figure 6 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture d' <i>Asterionellopsis glacialis</i> . ....	18
Figure 7 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de <i>Nitzschia sp.</i> .....	18
Figure 8 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de <i>Tetraselmis sp.</i> .....	19
Figure 9 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de <i>Chlamydomonas sp.</i> .....	20
Figure 10 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de <i>Synechococcus sp.</i> . ....	20
Figure 11 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de <i>Microcystis sp.</i> .....	21
Figure 12 : Estimation de la [Chl a] pour <i>Synechococcus sp.</i> à partir d'une valeur de [Chl a] fourni par le FluoroProbe et de la courbe de calibration entre mesure par le FluoroProbe et fluorimètre. ....	22

Figure 13 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour <i>Synechococcus sp.</i> avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des cellules à phycoérythrine en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées. ....	23
Figure 14 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phycoyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les cellules à phycoérythrine obtenue à partir de la SFS de <i>Synechococcus sp.</i> calibrée en laboratoire. ....	24
Figure 15 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phycoyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les chromophytes obtenue en moyennant les SFS de 7 espèces de chromophytes calibrées en laboratoire.....	24
Figure 16 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour <i>Pseudo-nitzschia sp.</i> avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des chromophytes en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées par fluorimétrie.....	25
Figure 17 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phycoyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les cellules à phycoyanine obtenue en moyennant les SFS des 2 espèces calibrées en laboratoire.....	26
Figure 18 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour <i>Microcystis sp.</i> avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des cellules à phycoyanine en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées. ....	27
Figure 19 : Evolution a) de la transmission (en %) et de la concentration en Chl a totale (en éq µg/L de Chl a) en fonction de la concentration en matière en suspension (en mg/L) pour un échantillon de <i>Asterionellopsis glacialis</i> . ....	28
Figure 20 : Evolution a) de la transmission (en %) et b) de la concentration en Chl a totale (en éq µg/L de Chl a) en fonction de la concentration en matière en suspension (en mg/L) pour un échantillon de <i>Prorocentrum sp.</i> ....	29
Figure 21 : Distribution (en % de la concentration en Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycoyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe pour une culture de <i>Tetraselmis sp.</i> de concentration en Chl a estimée avec le FluoroProbe à $9.7 \pm 0.64$ éq µg/L de Chl a et une gamme de concentration en MES.....	30
Figure 22 : Localisation des stations de mesures et prélèvements suivies dans le cadre du projet PHRESQUES. ....	31
Figure 23 : MonitBox – Bionef. ....	32
Figure 24 : a) Installation des instruments de mesure sur la perche ; b) positionnement de la perche sur le plat-bord du bateau. ....	32

Figure 25 : Concentration en chlorophylle a totale (en équivalent $\mu\text{g/L}$ de Chl a) mesurée avec le FluoroProbe à la station SMILE les 08 et 09 octobre 2017 (Leg 4). .....	34
Figure 26 : Concentration en chlorophylle a totale (en équivalent $\mu\text{g/L}$ de Chl a) mesurée avec le FluoroProbe à la station Fatouville le 06 février 2017 (Leg 1). .....	35
Figure 27 : Turbidité mesurée avec un turbidimètre de laboratoire HACH 2100N IS (Ifremer) lors du Leg 1 (6 au 11 février 2017) aux stations Fatouville, La Carosse, SMILE et BS1. ....	35
Figure 28 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en $\mu\text{g/L}$ Chl a) entre les 4 groupes phytoplanctoniques a) le 28 juin 2017 à la station BS1 (Leg 3) b) le 15 avril 2017 à la station SMILE (Leg 2) c) le 10 octobre 2017 à la station station La Carosse (Leg 4) et d) le 06 février 2017 à la station Fatouville (Leg 1). .....	37
Figure 29 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en $\mu\text{g/L}$ Chl a) entre les 4 groupes phytoplanctoniques à Poses le 13/07/17. ....	38
Figure 30 : Mesure de la concentration en chlorophylle a totale avec le FluoroProbe et l'AOA à la station La Carosse le 26 juin 2017 (Leg 3). .....	39
Figure 31 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en $\mu\text{g/L}$ Chl a) entre les 4 groupes phytoplanctoniques le 25 juin 2017 à la station SMILE (Leg 3) a) avec les signatures de fluorescence spectrale usines b) avec les signatures de fluorescence spectrale calibrées en laboratoire. ....	41

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres communs utilisés pour les mesures. ....	13
Tableau 2 : Coefficient de détermination $R^2$ entre les concentrations en Chl a mesurées sur des cultures de phytoplancton avec le FluoroProbe et celles mesurées avec un fluorimètre. ....	15
Tableau 3 : Comparaison de la SFS de <i>Synechococcus sp.</i> recalibré avec la valeur de [Chl a] estimée avec le FluoroProbe et celle estimée à partir de la courbe de calibration $f([\text{Chl a}]_{\text{fluoroprobe}})=[\text{Chl a}]_{\text{fluorimétrie}}$ .....	23
Tableau 4 : Comparaison de la SFS usine des chlorophytes avec la SFS de <i>Tetraselmis sp.</i> calibrée en laboratoire.....	25
Tableau 5 : Nouvelle matrice de signatures de fluorescence spectrale pour une utilisation avec la station de travail (jeu de paramètres « workstation ») adaptée à la Baie de Seine.....	27
Tableau 6 : Paramètres communs utilisés pour les mesures haute-fréquences in situ. ....	33
Tableau 7 : Nouvelle matrice de signatures de fluorescence spectrale pour une utilisation avec la station de travail (jeu de paramètres « standard ») adaptée à la Baie de Seine. ....	40





L'étude qui suit porte sur l'utilisation du spectrofluorimètre multi-spectral FluoroProbe (bbe Moldaenke) et s'intègre dans la première phase du projet PHRESQUES, plus précisément dans le volet mise en cohérence des mesures de la biomasse phytoplanctonique à l'échelle du territoire. L'objectif de ce volet est de quantifier et de caractériser la biomasse phytoplanctonique le long du continuum bassin versant-estuaire-baie de Seine. Pour cela un spectrofluorimètre multi-spectral a été sélectionné, le FluoroProbe de bbe Moldaenke.

Le FluoroProbe permet de discriminer quatre groupes phytoplanctoniques et leur biomasse respective. Pour cela il se base sur la signature de fluorescence spectrale (SFS) spécifique à chacun de ces groupes. La SFS est déterminée à partir de la mesure des intensités relatives de fluorescence après l'excitation des pigments par 5 LEDs de longueurs d'onde spécifiques (470, 525, 570, 590 et 610 nm). Initialement, ces SFS sont calibrées en usine avec des espèces d'eau douce pour les groupes des chlorophytes (appelés « green algae »), des chromophytes (appelés « diatoms »), des cyanobactéries riches en phycocyanine (appelées « bleugreen algae »), et des cryptophytes et plus largement des micro-algues riches en phycoérythrine (appelés « cryptophytes »).

Le FluoroProbe permet une étude du phytoplancton en continu en temps réel. Il peut être utilisé en laboratoire grâce à une station de travail dédiée (Workstation 25) qui permet de réaliser des mesures sur des petits volumes (25 mL) mais son utilisation principale se fait sur le terrain pour la réalisation de mesures *in situ* avec des profils sur la colonne d'eau ou en stationnaire à une profondeur définie pour un suivi temporel.

Les performances du FluoroProbe ont été étudiées de façon complémentaire sur des monocultures de phytoplancton en laboratoire et lors de campagnes sur le terrain en conditions *in situ*. Les capacités de cette sonde à fournir une estimation correcte de la biomasse phytoplanctonique (concentration en chlorophylle a) et de sa répartition entre les groupes phytoplanctoniques ont ainsi été évaluées afin de fournir des préconisations de déploiement et une calibration adaptée des SFS aux futurs sites d'implantation de la sonde.

# 1. Vérification des performances du FluoroProbe en laboratoire

## 1.1. Identification et mise en culture des souches de travail

Les espèces phytoplanctoniques les plus communément observées en région baie de Seine, Manche-Mer du Nord, ainsi que pour les eaux de la Seine ont été sélectionnées dans différentes collections. L'effort a été concentré sur les micro-algues du type chromophyte (diatomées, haptophytes et dinoflagellés essentiellement) qui dans la région prédominent en général sur les autres groupes. 17 souches ont été sélectionnées :

### Chromophytes :

#### 6 Diatomées :

- *Asterionellopsis glacialis*
- *Chaetoceros sp.*
- *Skeletonema sp.*
- *Pseudo-nitzschia pungens*
- ***Nitzschia sp.***

#### 1 Prymnsiophycées :

- *Phaeocystis sp.*

#### 2 Dinoflagellés :

- *Prorocentrum micans*
- *Gymnodinium sp.*

### Chlorophytes :

#### 1 Prasinophycées :

- *Tetraselmis sp.*

#### 2 Chlorophycées :

- ***Chlamydomonas sp.***
- ***Desmodesmus sp.***

### Cellules à phycocyanines :

#### 3 Cyanobactéries :

- *Anabaena cylindrica*
- *Synechococcus sp.*
- *Microcystis aeruginosa*

### Cellules à phycoérythrine :

#### 2 Cryptophycées :

- *Rhodomonas sp.*
- *Chroomonas sp.*

Les souches d'eau de mer sont issues de la collection de cultures de micro-algues de l'Université de Caen Normandie «Algobank-Caen » ainsi que de la collection de cultures de Roscoff « Roscoff Culture Collection ». Les souches d'eau douce (en gras dans la liste ci-dessus) sont issues de la collection du Muséum National d'Histoire Naturelle « Algothèque ALCP/PMC WDCM 792 ».

Une aliquote de 15 mL nous a été fourni pour chacune des souches. Du milieu K/2 a été utilisé pour les souches d'eau de mer, du milieu Z8 pour les souches de *Microcystis sp.* et *Anabaena cylindrica*, du milieu DM2 MOPS pour les souches de *Nitzschia sp.*, *Desmodesmus sp.* et *Chlamydomonas sp.*, et du milieu Red Sea Salt BG-11 pour *Synechococcus sp.* (recettes des milieux dans l'Annexe A).

Cette aliquote est d'abord mis à acclimater (température, luminosité) en salle de culture pendant 1 à 2 semaines selon les souches. Puis le volume de la culture est augmenté selon la technique des volumes croissants avec le milieu adapté. La transition de volume se fait tous les 7 jours environ, dans des contenants différents pour éviter que la biomasse bactérienne n'explose.

Pour chaque souche un aliquot de 15 mL est conservé et repiqué régulièrement afin de pouvoir réutiliser la souche si nécessaire.

## 1.2. Estimation de la concentration en chlorophylle a

Une série de tests a été réalisée en laboratoire afin d'évaluer les performances du FluoroProbe. Pour l'estimation de la concentration en chl *a*, Bbe Moldaenke annonce une plage de mesure comprise entre 0 et 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , une résolution de 0.01  $\mu\text{g.L}^{-1}$  et une limite de détection de 0.02  $\mu\text{g.L}^{-1}$  dans des conditions très favorables (mono-culture en laboratoire, Beutler et al., 2002).

Différentes performances du FluoroProbe ont été évaluées :

- Est-ce que les valeurs de Chl *a* mesurées avec le FluoroProbe sont justes par rapport à une méthode de référence pour l'estimation de la concentration en Chl *a* ?
- La réponse du FluoroProbe pour une gamme de Chl *a* est-elle linéaire ?
- Quelle est la précision de la mesure ?
- Quelle est la limite de détection du FluoroProbe?

Différentes techniques sont couramment utilisées pour estimer la concentration en Chl *a* :

- La mesure peut être faite sur de la chlorophylle extraite à l'aide d'un solvant puis la concentration en Chl *a* est déterminé par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), fluorimétrie, ou spectrophotométrie. La méthode basée sur des mesures de fluorimétrie est moins sensible que l' HPLC et est utilisée comme méthode de référence par le SOMLIT et dans de très nombreux travaux de recherche car elle est beaucoup plus rapide à mettre en œuvre et moins coûteuse. La méthode utilisant la

spectrophotométrie est beaucoup moins sensible que les mesures de fluorimétrie et est peu utilisée. Cette méthode n'est pas testée dans nos essais. Deux solvants sont principalement utilisés, l'acétone et le méthanol. Le méthanol permet une extraction plus rapide mais est beaucoup plus toxique que l'acétone. L'acétone est par conséquent beaucoup plus utilisé, il est notamment le solvant utilisé par le réseau SOMLIT.

- La mesure peut être réalisée sur de la chlorophylle *in vivo* avec un fluorimètre (mono ou multi-spectral comme le FluoroProbe). Les mesures sont instantanées et peuvent être nombreuses, faciles d'utilisation, ces instruments sont particulièrement adaptés aux mesures sur le terrain (profil sur la colonne d'eau, mesures hautes-fréquences...).

Malgré les nombreux avantages dans l'utilisation des fluorimètres de terrain, les données issues de ces mesures sont à prendre avec précautions. Il est en effet difficile de transposer les mesures réalisées sur de la chlorophylle *in vivo* avec un fluorimètre de terrain (données en équivalent  $\mu\text{g/L}$  de Chl *a*) en une concentration en Chl *a* mesurée sur de la chlorophylle extraite. En effet des processus biologiques liés à l'absorption de la lumière par le phytoplancton et aux quenchings non et photochimiques influencent les valeurs de fluorescence *in vivo* de manière non linéaire par rapport à la biomasse chlorophyllienne.

Les mesures en laboratoire sont réalisées avec le FluoroProbe FP-23-59 couplé à une station de travail Workstation 25 (bbe Moldaenke, GmbH) avec sa cuvette de 25 mL en quartz, l'échantillon est maintenu en suspension avec un agitateur magnétique intégré à la station de travail (Figure 1).



Figure 1: Photo du FluoroProbe sur la station de travail avec sa cuve en quartz de 25 mL.

Les échantillons en attente de mesure sont conservés à l'obscurité dans un béccher recouvert de papier aluminium au minimum 10 minutes afin de réduire le quenching photochimique. Ce phénomène altère en effet la mesure de fluorescence. Par exemple sur la Figure 2, pour une culture de *Skeletonema sp.* (chromophyte) qui n'a pas été mise à l'obscurité avant la mesure, on observe que même après 30 minutes de mesure la concentration totale en chlorophylle a ([TChl a] en  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) augmente toujours.

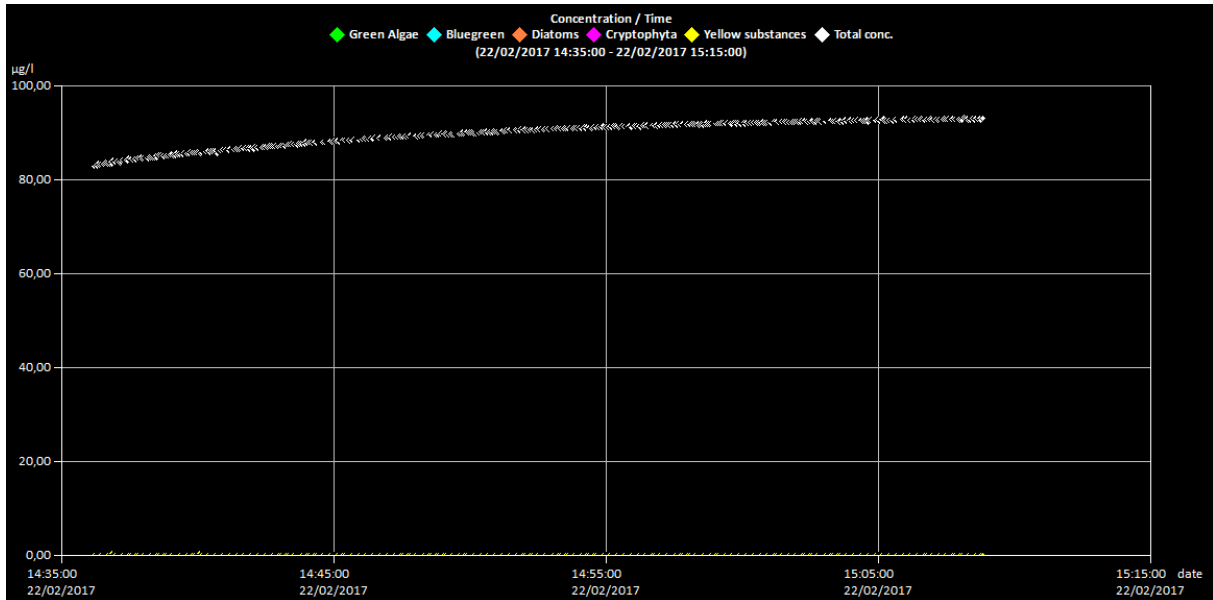


Figure 2 : Visualisation avec le logiciel bbe ++ de la concentration en chlorophylle a totale (en  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) et de la fraction pour chaque groupe phytolanc tonique en fonction du temps pour une culture de *Skeletonema sp.* laissée à la lumière avant la mesure.

Après 20 minutes à l'obscurité, le même échantillon est réanalysé (Figure 3), on observe que la mesure est stable et ne varie pas dans le temps. Par ailleurs, la [TChl a] mesurée par le FluoroProbe après mise à l'obscurité de l'échantillon est d'en moyenne 100  $\mu\text{g/L}$  de Chl a contre environ 93  $\mu\text{g/L}$  de Chl a en fin de mesure lorsque l'échantillon n'est pas placé à l'obscurité avant la mesure (Figure 2).

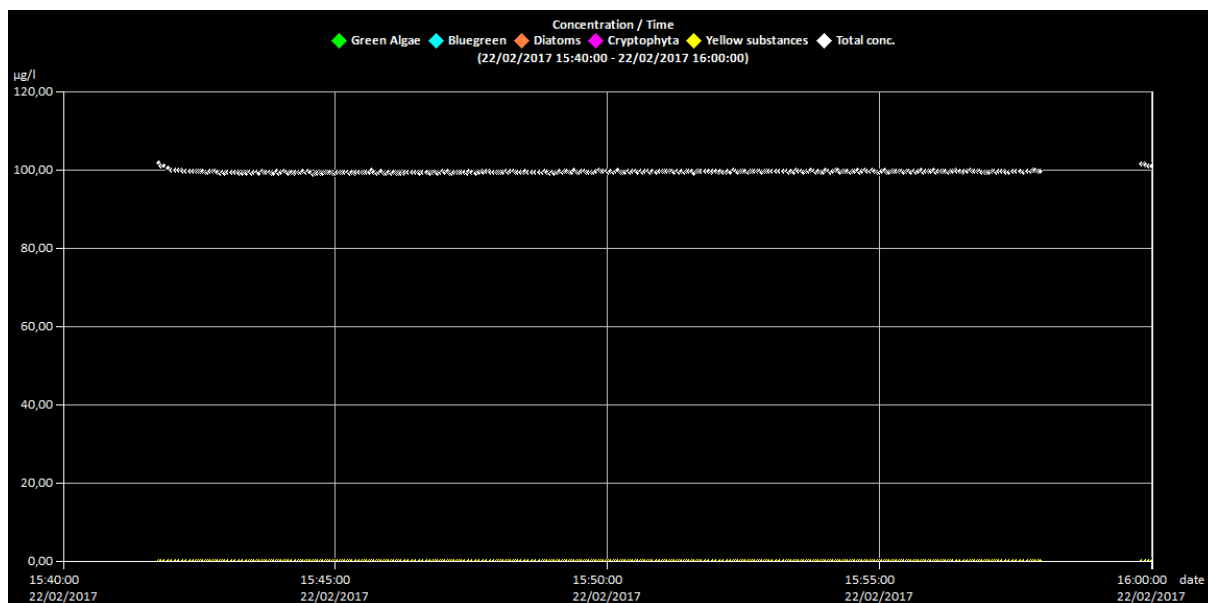


Figure 3 : Visualisation avec le logiciel bbe ++ de la concentration en chlorophylle a totale (en  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) et de la fraction pour chaque groupe phytolanc-tonique en fonction du temps pour une culture de *Skeletonema sp.* mise à l'obscurité 20 minutes avant.

Le jeu de paramètres utilisé nommé "workstation" et fourni par bbe Moldaenke est spécifique à l'utilisation de la station de travail. De même, un facteur de correction de 0.7 défini par bbe Moldaenke est appliqué pour l'ensemble des groupes phytoplanctoniques et pour la CDOM (colored dissolved organic matter).

Les paramètres communs (onglet « common parameters ») utilisés pour les mesures sont répertoriés dans le tableau 1. Pour les classes algales et leurs signatures spectrales (onglet « Fit parameters »), les paramètres d'usine sont dans un premier temps conservés, comme pour les paramètres de mesure et de turbidité (onglets « measurement parameters » et « turbidity parameters »).

Un blanc des offsets (cf Annexe B) est réalisé avant la série de mesures avec de l'eau distillée (« distilled water offset ») puis avec de l'eau de mer filtrée sur une unité de filtration ( $0.2 \mu\text{m}$ ) Steritop<sup>TM</sup> (« ultra-filtrated seawater offset »). Les valeurs de ces blancs seront directement pris en compte dans les calculs de concentration en Chl a dans les paramètres ci-dessus.

Pour chaque échantillon 50 mesures sont réalisées sur des triplicats d'échantillons.

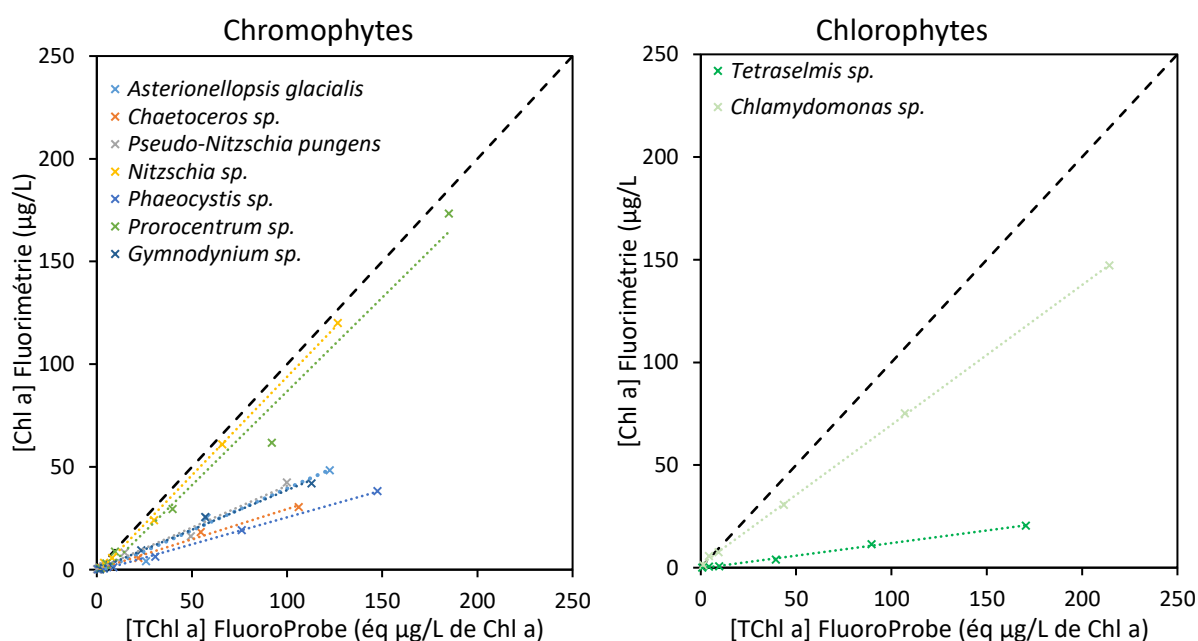
Tableau 1 : Paramètres communs utilisés pour les mesures.

Name	Value	Unit
Warm-up time	5	s
Measurement interval	0	s
Number of measurements	50	
LED measuring time	20	1/10s
Measuring type	continuous	
Measurement time	20	1/10s
Send results	on	
Power-down after measurement	off	

Store results	on	
Start measurement on power-up	off	
Enter comment at start of measurement	off	
Air pressure from first measurement	off	
Calculate concentrations after each measurement	off	
Serial number	2359	
Software version	265	
Name of parameter set	Workstation	

Afin d'évaluer la justesse des mesures faites en laboratoire avec le FluoroProbe une gamme de 6 concentrations en Chl *a* comprises entre 0.05 et 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (valeurs mesurées avec le FluoroProbe) a été réalisée pour chacune des espèces. Nous nous sommes basés sur les valeurs fournies par le FluoroProbe pour réaliser chaque gamme car il n'existe aucune méthode permettant d'avoir la concentration en Chl *a* extraite instantanément (pour la fluorimétrie par exemple l'échantillon nécessite une extraction à l'acétone d'une nuit avant de pouvoir faire la mesure). La concentration en Chl *a* de chaque standard est en parallèle estimée par fluorimétrie en duplicat. Par ailleurs, travaillant sur des cultures de phytoplancton les concentrations en Chl *a* des 6 standards des gammes présentent des valeurs proches mais variables entre les espèces.

Globalement la concentration en Chl *a* *in vivo* estimée par le FluoroProbe est, pour la majorité des espèces marines et d'eau douce (sauf *Anabaena cylindrica*), supérieures à la concentration en Chl *a* extraite mesurée par fluorimétrie en laboratoire (Figure 4). Cette surestimation par le FluoroProbe varie en fonction de l'espèce, ainsi aucun facteur de correction ne peut être proposé pour estimer plus précisément la concentration en Chl *a* avec le fluoroprobe.



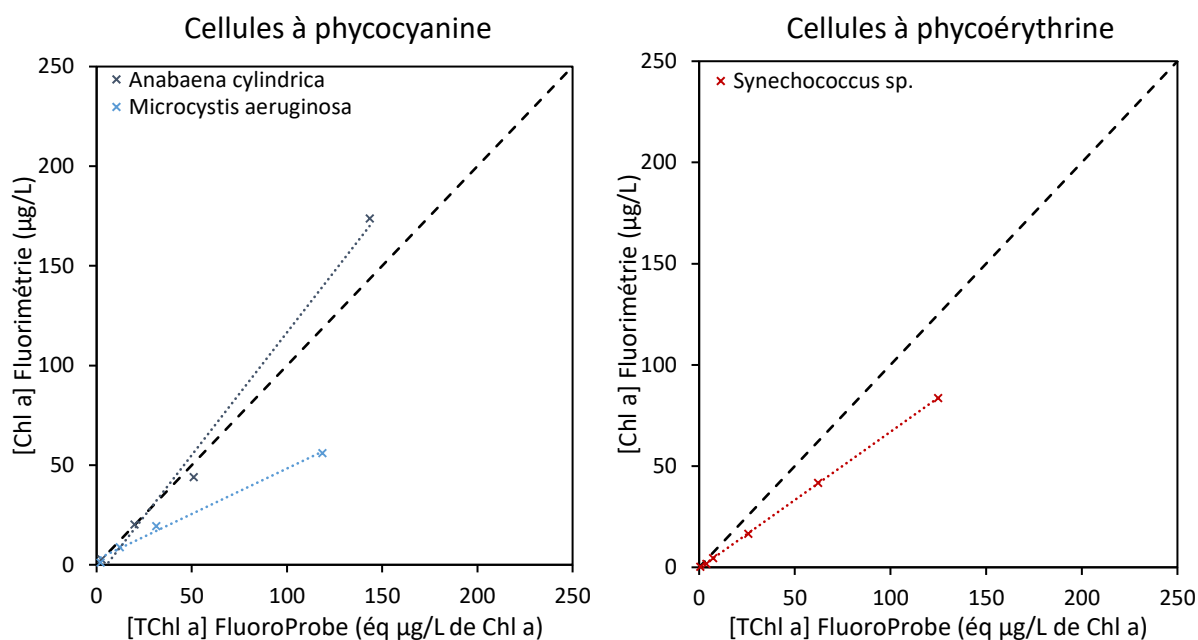


Figure 4 : Comparaison des concentrations en Chl a mesurées sur des cultures de phytoplancton par fluorimétrie (Chl a extraite en µg/L) avec celles mesurées avec le FluoroProbe (Chl a in vivo en équ µg/L de Chl a) pour les groupes a) Chromophytes b) Chlorophytes

Sur la Figure 4, on note que la réponse du FluoroProbe à l'augmentation de Chl a est linéaire par rapport à la concentration en Chl a extraite (en moyenne  $R^2=0,9914 \pm 0,0077$  ; Tableau 2). La calibration avec un standard de référence (Fluorescéine,  $\lambda_{ex}=460$  nm;  $\lambda_{em}=515$  nm, réf VWR 1.08462.0100) a également montré une bonne linéarité ( $R^2=0.9939$ , Figure 5). Bien que le FluoroProbe ne permette pas d'apporter une estimation précise de la concentration en Chl a in situ, il pourra fournir une indication sur son évolution temporelle.

Tableau 2 : Coefficient de détermination  $R^2$  entre les concentrations en Chl a mesurées sur des cultures de phytoplancton avec le FluoroProbe et celles mesurées avec un fluorimètre.

Espèce	$R^2$
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	0,9792
<i>Chaetoceros sp.</i>	0,9910
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	0,9825
<b><i>Nitzschia sp.</i></b>	<b>0,9989</b>
<i>Phaeocystis sp.</i>	0,9984
<i>Prorocentrum sp.</i>	0,9795
<i>Gymnodinium sp.</i>	0,9888
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,9965
<b><i>Chlamydomonas sp.</i></b>	<b>0,9998</b>
<i>Synechococcus sp.</i>	0,9999
<i>Anabaena cylindricus</i>	0,9888
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,9927
Moyenne	0,9914
Ecart type	0,0077



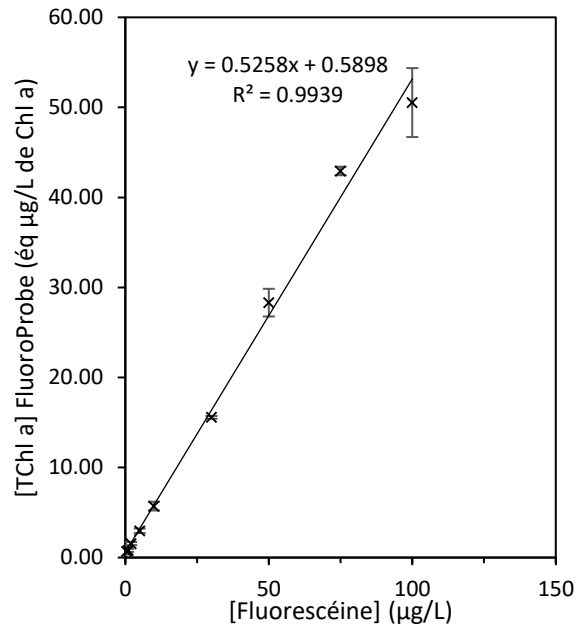


Figure 5 : Concentration en Chl a estimée avec le FluoroProbe (en équ µg.L-1 de Chl a) pour une gamme de concentration en fluorescéine.

La précision de la mesure dans l'estimation de la concentration en Chl a totale a été évaluée à partir du coefficient de variation pour chaque standard de la gamme de concentration en chlorophylle a et pour chaque espèce.

Quelle que soit l'espèce testée, les mesures pour le standard Chl6 (dont la concentration varie entre 0.1 et 1.7 équ µg/L de Chl a) présentent un fort coefficient de variation (entre 11 et 122%) avec une moyenne de 55%. Les espèces avec les concentrations du standard Chl6 les plus élevées sont celles avec les coefficients de variation les plus faibles.

Pour le standard Chl5 dont la concentration varie entre 1.31 et 5.86 équ µg/L de Chl a selon les espèces, la moyenne des coefficients de variation est de 8%. Ils varient entre 4 et 20 % mais au contraire de Chl6 ne sont pas corrélée aux différences de concentration.

Pour les standards de concentration supérieure (Chl4 à Chl1), les moyennes des coefficients de variations sont inférieures à 5% indiquant une meilleure stabilité de la mesure.

En condition optimale de mesure (monoculture en laboratoire), la précision du FluoroProbe devient satisfaisante (inférieure à 5%) pour des concentrations en Chl a comprise entre 4 et 10 équ µg/L de Chl (selon l'espèce) pour une mesure avec le FluoroProbe et entre 1 et 9 µg/L pour une mesure avec un fluorimètre sur de la chlorophylle extraite.

Ces observations sont cependant à nuancer. En effet l'estimation de la Chl a *in vivo* en laboratoire sur des cultures va être fortement tributaire de l'état physiologique de la culture. La morphologie propre à chaque espèce va également potentiellement pouvoir influencer sur cette estimation (taille de la cellule, chaînes, mobilité grâce à un flagelle...). Il sera intéressant de comparer ces observations avec l'évaluation des performances sur le terrain en conditions *in situ*.

### 1.3. Distribution de la concentration en chlorophylle a entre les 4 groupes phytoplanctoniques

#### 1.3.1. Tests en laboratoire avec les Signatures Spectrales de Fluorescence calibrées en usine

Chaque sonde est fournie avec un jeu de paramètres « usine » qui comprend notamment les signatures spectrales de fluorescence (SFS) qui ont été définies à partir de cultures d'espèces phytoplanctoniques d'eau douce (Beutler et al., 2012). Les 4 groupes initialement nommés « green algae », « bluegreen », « diatoms », et « cryptophyta » ont été renommés respectivement « chlorophytes », « cellules à phycocyanine », « chromophytes » (diatomées, haptophytes, dinoflagellés), et « cellules à phycoérythrine ». En effet, les groupes initialement définis ne sont pas forcément adaptés. Par exemple les cyanobactéries sont en général considérées comme des « algues bleues-vertes » du fait de la présence régulière d'un pigment accessoire de couleur bleue, la phycocyanine. Cependant, certaines espèces possèdent majoritairement un autre pigment, la phycoérythrine, qui lui aussi fait partie de la famille des phycobilines mais qui présente une couleur rouge. Ainsi, bien que du même genre, les cyanobactéries pourront selon l'espèce (et donc la présence en plus ou moins grande quantité de phycocyanine et de phycoérythrine) être classées par le FluoroProbe dans 2 groupes algaux distincts, soit les « cellules à phycocyanine », soit les « cellules à phycoérythrine » qui sont plus couramment associés aux cryptophytes.

Lorsque des mesures sont réalisées avec le fluoroprobe, la concentration totale de l'échantillon en chlorophylle a ([TChl a] en  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) est évaluée d'une part et d'autre part la fraction de cette Chl a attribuable à chaque groupe cité ci-dessus est fournie grâce à un algorithme de calcul (Beutler et al., 2002). C'est ici cette fraction qui nous intéresse dans l'objectif de pouvoir réaliser un suivi *in situ* de la dynamique des populations phytoplanctoniques. Le même jeu de données (qui comprend notamment la [TChl a], et la part de chaque groupe phytoplanctonique (en  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) que pour l'estimation de la [Chl a] avec la gamme de 6 concentrations (Chl1 à Chl6, en concentration décroissante) a été utilisé.

Pour les espèces de chromophytes testées (*Asterionellopsis glacialis* par exemple, Figure 6), à la Chl6 (comprise entre au minimum 0.07  $\mu\text{g/L}$  pour *Gymnodinium sp.* et au maximum 0.63  $\mu\text{g/L}$  pour *Prorocentrum micans* mesurée en fluorimétrie) une fraction (entre 30 et 42 %) de la [TChl a] est attribuée aux chlorophytes (sauf pour *Gymnodinium sp.*) et pour *Asterionellopsis glacialis*, *Chaetoceros sp.*, *Phaeocystis sp.*, et *Prorocentrum micans* une partie est également attribuée aux cellules à phycocyanine et à phycoérythrine (entre 1 et 2 %, et entre 1 et 17 % respectivement).

Par ailleurs, la part attribuée aux chlorophytes diminue lorsque la [TChl a] augmente, sauf pour *Gymnodinium sp.* qui présente une tendance inverse (le % de chlorophyte augmente avec la [TChl a]). Cette observation pourrait être liée au fait que comme montré précédemment la précision de la mesure avec le FluoroProbe augmente avec la [Chl a], la précision de la mesure n'étant en particulier pas satisfaisante pour Chl6.

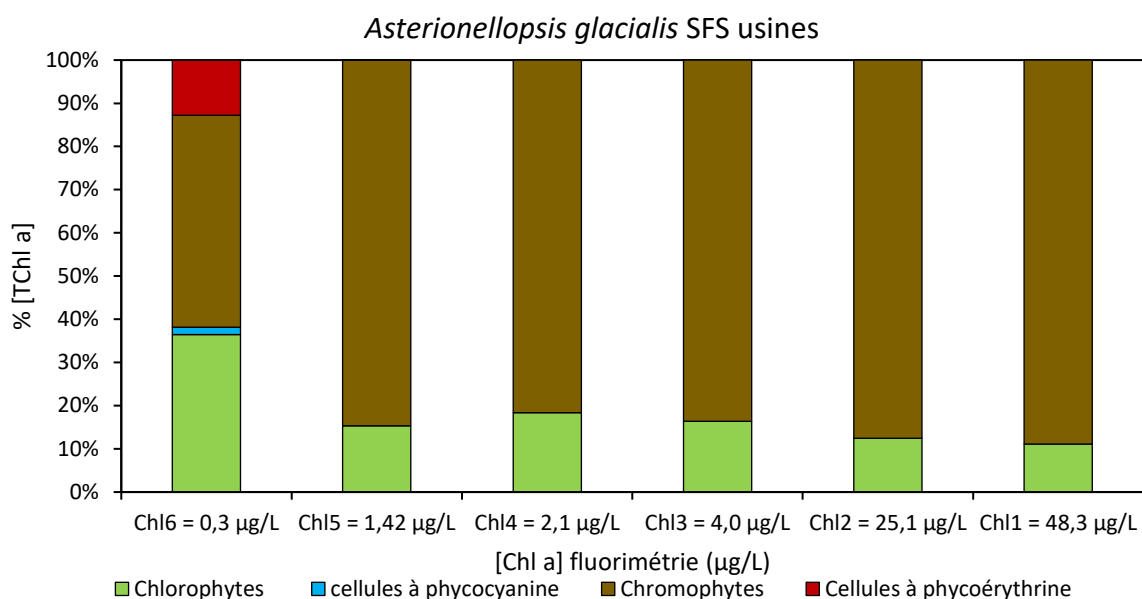


Figure 6 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture d'*Asterionellopsis glacialis*.

Pour *Nitzschia sp.* (Figure 7), l'espèce d'eau douce sélectionnée pour les chromophytes, bien que la surestimation de la [Chl a] par le FluoroProbe soit moins importante que celle pour les espèces d'eau douce, on observe qu'avec les SFS usine une part de la [TChl a] est attribuée aux chlorophytes (en particulier pour Chl6 avec 72 % de la [TChl a]). Comme pour les espèces d'eau de mer cette fraction diminue considérablement lorsque la [Chl a] augmente.

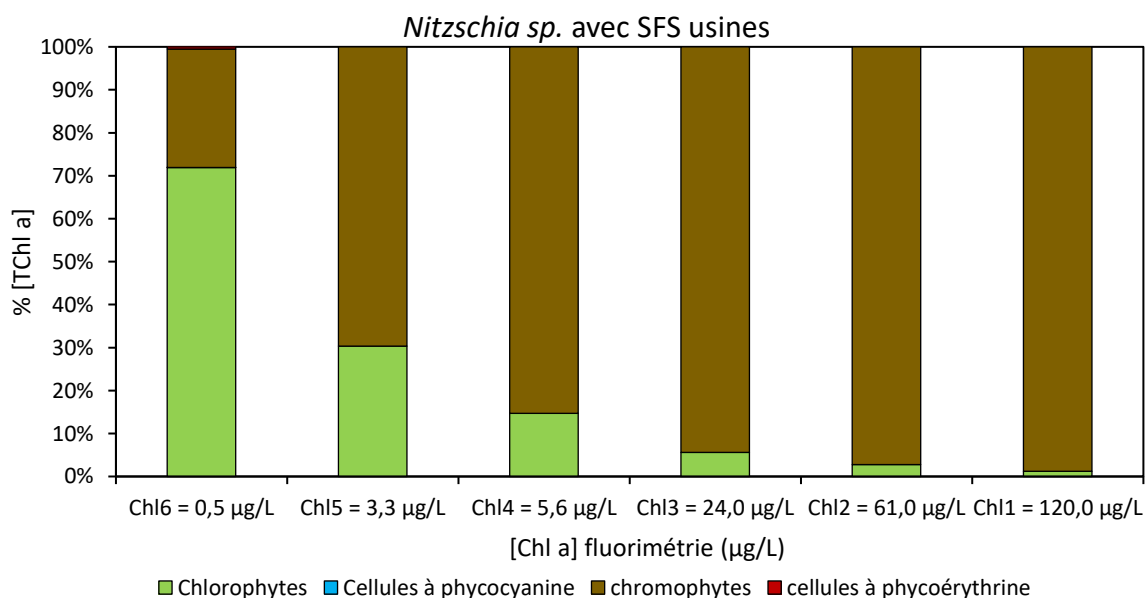


Figure 7 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de *Nitzschia sp.*.

Pour les chlorophytes d'eau de mer (*Tetraselmis sp.*, Figure 8), pour la Chl6 (0.05 µg/L) bien que la majeure partie de la [TChl a] soit attribuée au groupe des chlorophytes (64 %), 27 % est attribué aux chromophytes et 6 % et 3 % aux cellules à phycoérythrine et phycocyanine respectivement. Comme pour les chromophytes, la fraction attribuée au bon groupe (chlorophytes) augmente avec la [TChl a], pour être de 100 % à partir de Chl3 (3,9 µg/L).

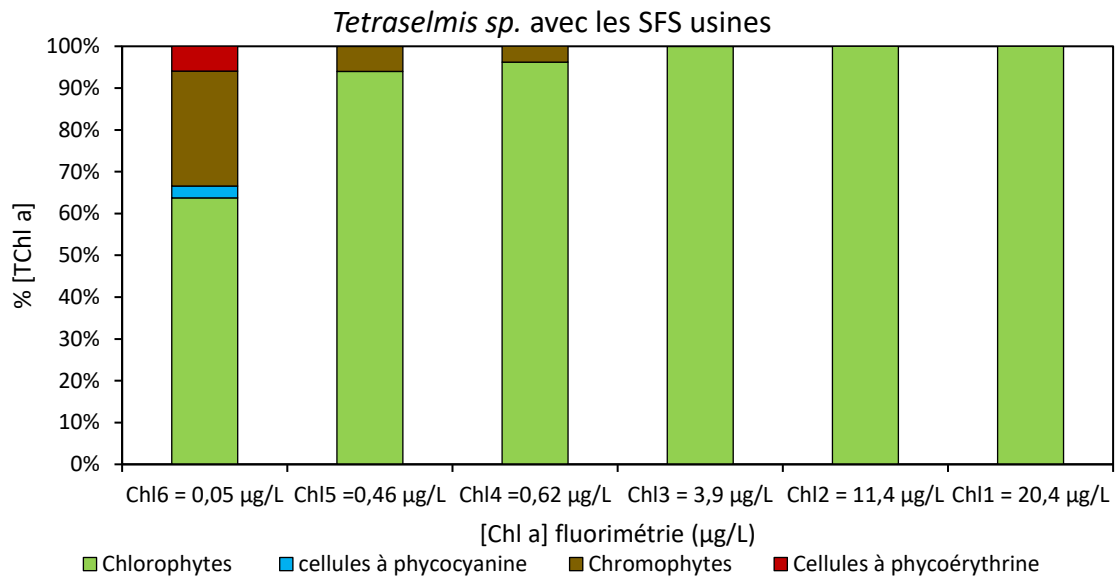


Figure 8 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de *Tetraselmis sp.*.

Pour les chlorophytes d'eau douce (par exemple *Chlamydomonas sp.*, Figure 9), la distribution des groupes phytoplanctoniques est similaire à celle observée pour *Tetraselmis sp.*, avec pour Chl6 et Chl5 (plus proche des Chl4 et Chl3 de *Tetraselmis sp.* car le FluoroProbe surestime moins la [TChl a]) de 91 % et 99 % de la [TChl a] attribuée aux chlorophytes, la fraction restante étant attribuée aux chlorophytes. Au-delà de Chl4 (7.5 µg/L) la totalité de la [TChl a] est attribuée au chlorophytes.

Outre pour les très faibles concentrations testées (Chl6 de *Tetraselmis sp.*), la SFS usine pour le groupe des chlorophytes semble bien adaptée. A partir de [Chl a] 0.46 µg/L pour *Tetraselmis sp.* et 1.2 µg/L pour *Chlamydomonas sp.*, plus de 90 % de la [TChl a] sont attribués au bon groupe (Chlorophytes). La SFS usine des chlorophytes sera néanmoins comparée à celles des différentes espèces de chlorophytes afin d'observer s'il y existe des différences notables entre les deux.

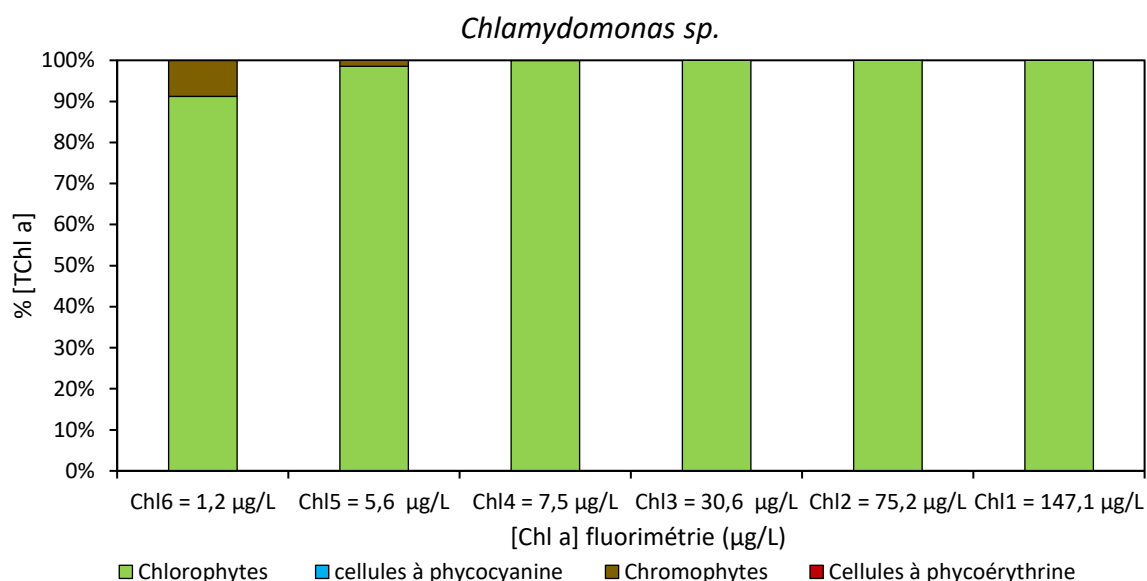


Figure 9 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de *Chlamydomonas sp.*.

Pour les cellules à phycoérythrine, *Rhodomonas sp.* et *Chroomonas sp.* qui sont des cryptophycées se sont avérées être très pauvres en phycoérythrine et ainsi détectées par le FluoroProbe comme des chlorophytes (avec des SFS très similaires à celles des espèces de chlorophytes testées). Au contraire, l'espèce de *Synechococcus sp.* sélectionnée (originaires de la Manche) pour le groupe des « algues bleues-vertes » associé aux cyanobactéries est très riches en phycoérythrine et a ainsi été détecté par le FluoroProbe comme des cryptophytes et chromophytes (Figure 10). *Synechococcus sp.* a donc été associé au nouveau groupe des cellules à phycoérythrine, pour les cellules à phycocyanine *Anabaena cylindrica* et *Microcystis aeruginosa* (2 espèces d'eau douce) ont été utilisées pour la calibration.

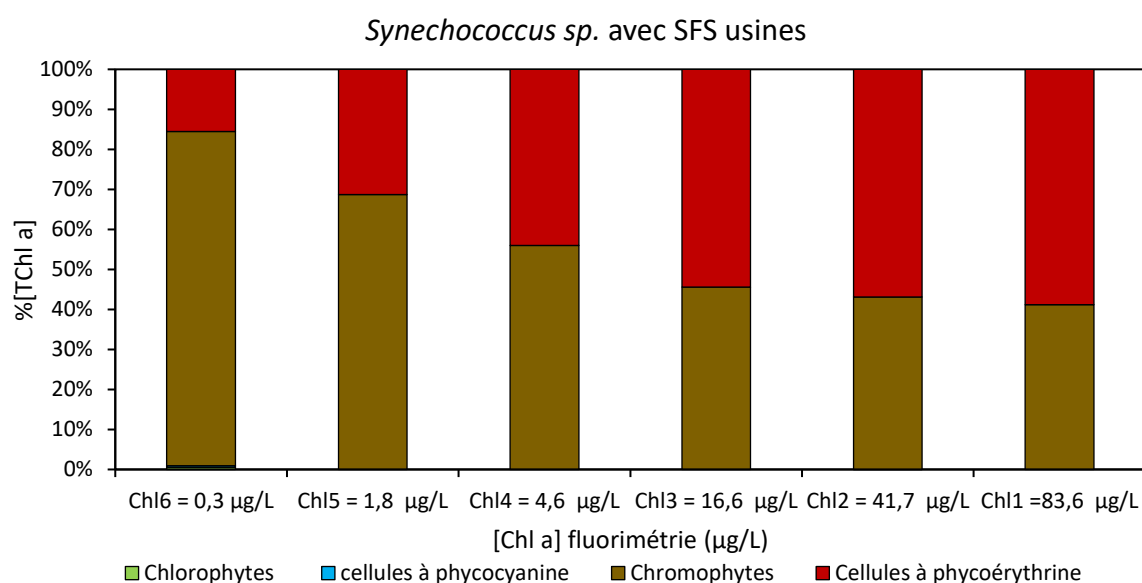
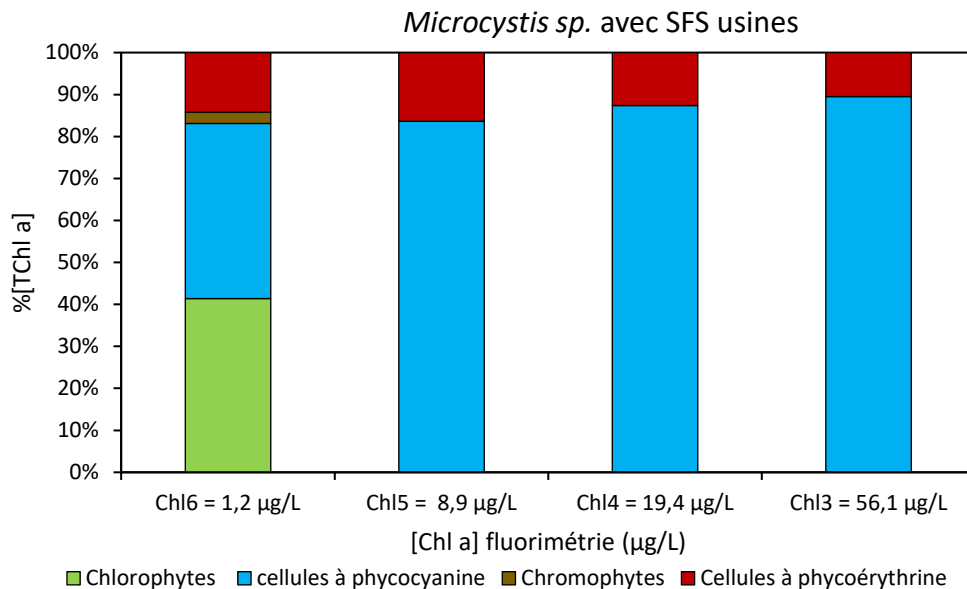


Figure 10 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de *Synechococcus sp.*.

Pour les cellules à phycocyanine (par exemple *Microcystis sp.*, Figure 11), comme pour les autres groupes la [TChl a] pour la Chl6 (ici 1.2 µg/L) est fractionnée entre les 4 groupes (majoritairement chlorophytes et cellules à phycocyanine, 41 et 42 % respectivement). Pour les autres concentrations testées, les cellules à phycocyanine sont identifiées pour la majeure partie de la [TChl a] (entre 84 et 89 %), la fraction restante est attribuée aux cellules à phycoérythrine. Bien que cette distribution soit cohérente, les cyanobactéries contenant à la fois de la phycocyanine et de la phycoérythrine, il faut recalibrer la SFS pour que les espèces avec une majorité de phycocyanine apparaissent en un seul groupe.



*Figure 11 : Distribution (en % de la Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe (avec les SFS usines) pour une culture de Microcystis sp..*

Globalement, outre pour les chlorophytes qui présentent une SFS adaptée, une recalibration des SFS est nécessaire pour améliorer la distribution de la [TChl a] entre les différents groupes et assurer un meilleur suivi de la dynamique des groupes phytoplanctoniques identifiés. De plus l'instabilité observée à Chl6 dans l'estimation de la [TChl a] par le FluoroProbe se retrouve dans la distribution des groupes phytoplanctoniques. Pour les faibles [Tchl a] (variable selon les groupes), le FluoroProbe ne semble pas adapté pour suivre la dynamique du phytoplancton, cette observation étant à confirmer après recalcul avec les SFS recalibrées.

### 1.3.2. Définition de nouvelles Signatures Spectrales de Fluorescence

La SFS spécifique à chaque espèce est définie à partir de la culture mère diluée afin d'avoir une concentration en chlorophylle a [Chl a] comprise entre 50 et 100 µg.L<sup>-1</sup>. Comme mis en évidence précédemment le FluoroProbe surestime la concentration en Chl a (en comparaison des valeurs obtenues avec un fluorimètre en laboratoire) or pour la calibration des SFS la [Chl a] de l'échantillon est demandée. Nous nous sommes dans un premier temps basé

sur la mesure de la [Chl a] réalisée par le FluoroProbe pour réaliser la calibration. Une fois la nouvelle SFS obtenue, elle a été utilisée pour recalculer la distribution des groupes de l'échantillon. Pour la culture de *Synechococcus sp.* par exemple (les tendances détaillées ci-après étant similaires pour les chromophytes), on observe qu'avant le recalcul le FluoroProbe attribue entre 38 et 83 % au groupe des chromophytes et entre 16 et 62 % au groupe des cellules à phycoérythrine. Après recalcul avec la nouvelle SFS entre 0 et 10 % est attribué au groupe des chromophytes, entre 1 et 18 % au groupe des chlorophytes et entre 70 et 97 % au groupe des cellules à phycoérythrine.

Un autre test a été d'utiliser pour la calibration la [Chl a] estimée à partir de la courbe de calibration réalisée en amont pour l'espèce (et qui corrige ainsi la surestimation de la [TChl a] par la sonde pour une espèce donnée, Figure 12). De la même manière, la nouvelle SFS obtenue (différente de la précédente, Tableau 3) a été utilisée pour un recalcul. Avec cette nouvelle SFS entre 0 et 14 % est attribuée aux chromophytes, entre 2 et 23 % aux chromophytes et entre 60 et 95 % au groupe des cellules à phycoérythrine (Figure 13). Bien que cette nouvelle SFS permette d'augmenter considérablement la part attribuée aux cellules à phycoérythrine, la SFS issue de la calibration avec la [Chl a] fournie par le FluoroProbe propose une part plus importante. Il faut cependant noter que le recalcul avec la SFS avec la [Chl a] estimée à partir de la courbe de calibration réalisée en amont avec le fluorimètre surestime moins la [Chl a]. Le facteur de correction à appliquer pour s'aligner sur les [Chl a] mesurées en fluorimétrie restant différent selon les espèces d'un même groupe, la méthode permettant d'obtenir une meilleure estimation de la distribution des groupes phytoplanctoniques a été privilégiée (i.e. calibration des SFS basée sur la [Chl a] donnée par le fluoroprobe).

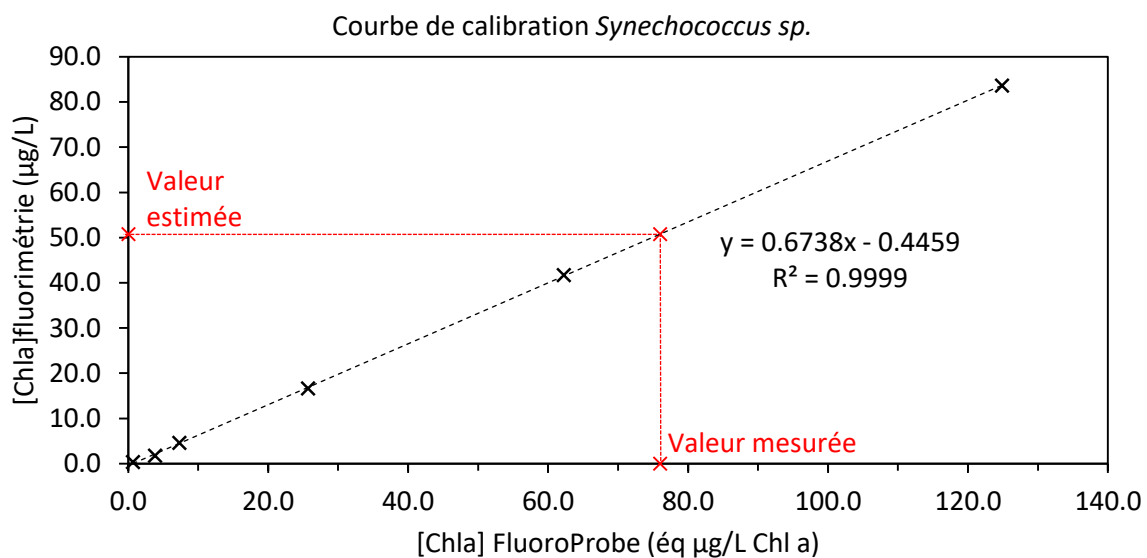


Figure 12 : Estimation de la [Chl a] pour *Synechococcus sp.* à partir d'une valeur de [Chl a] fourni par le FluoroProbe et de la courbe de calibration entre mesure par le FluoroProbe et fluorimètre.

Tableau 3 : Comparaison de la SFS de *Synechococcus sp.* recalibré avec la valeur de [Chl a] estimée avec le FluoroProbe et celle estimée à partir de la courbe de calibration  $f([Chl a]_{fluoroprobe}) = ] Chl a]_{fluorimétrie}$

	[Chl a]fluoroprobe= 76 éq µg/L de chl a	[chl a]fluorimétrie= 51 µg/L
longueur d'onde (nm)	Intensité relative de fluorescence	
370	1,0067	1,5151
470	1,7269	2,5806
525	5,5365	8,2368
570	0,7388	1,1106
590	0,7931	1,1567
610	0,4031	0,5830

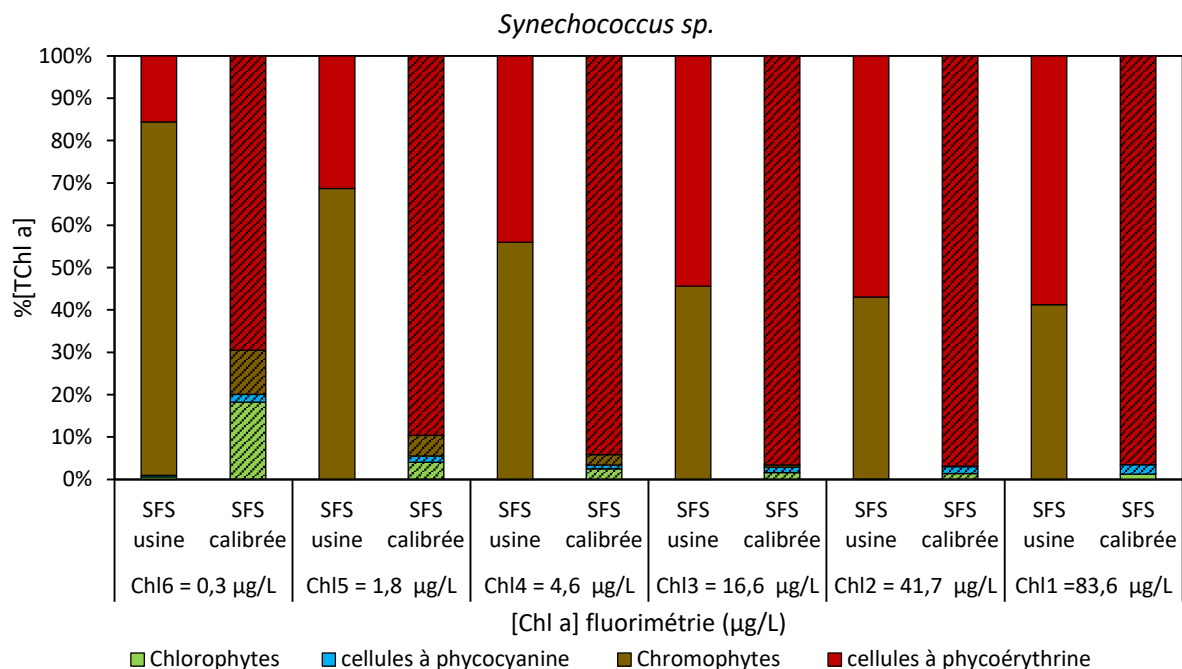


Figure 13 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour *Synechococcus sp.* avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des cellules à phycoérythrine en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées.

Si la définition d'une nouvelle SFS pour les cellules à phycoérythrine à partir de la SFS de la souche de *Synechococcus sp.* a permis de considérablement augmenter la fraction de cellule à phycoérythrine après recalcul des données de *Synechococcus sp.*, on note que cette nouvelle SFS présente des intensités relatives de fluorescence qui sont très différentes de celles des SFS usines des cellules à phycocyanine et à phycoérythrine (Figure 14). L'intensité relative de fluorescence pour la LED à 525 nm en particulier est très élevée pour la nouvelle SFS en comparaison de celle des SFS usines des cellules à phycocyanine et à phycoérythrine (5.54 contre 0.63 et 2.50 respectivement). De même les intensités relatives de fluorescence pour les LEDs à 590 et 610 nm sont faibles pour la nouvelle SFS en comparaison de celle des SFS



usines des cellules à phyco cyanine et à phycoérythrine. Pour ces raisons, il a été décidé de conserver les SFS usines des groupes des cellules à phycoérythrine.

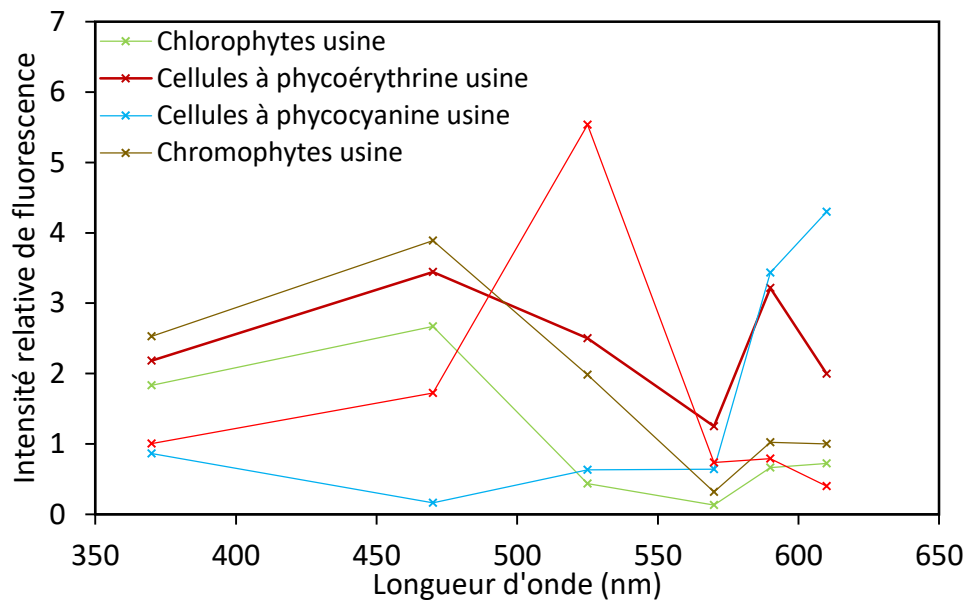


Figure 14 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phyco cyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les cellules à phycoérythrine obtenue à partir de la SFS de *Synechococcus sp.* calibrée en laboratoire.

Pour le groupe des chromophytes, une moyenne a été calculée avec l'ensemble des SFS des espèces appartenant à ce groupe (Figure 15). Bien que proche de la SFS usine, cette nouvelle SFS présente des similitudes avec la SFS des chlorophytes pour les plus grandes longueurs d'onde. La distinction entre chromophytes et chlorophytes se fera ainsi sur les plus basses longueurs d'ondes (470 et 525 nm).

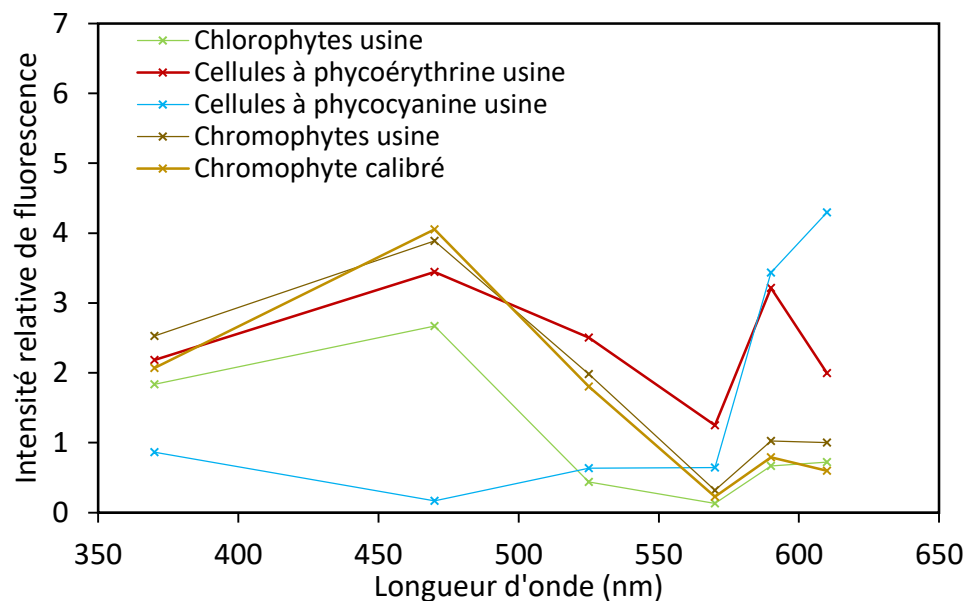


Figure 15 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phyco cyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les chromophytes obtenue en moyennant les SFS de 7 espèces de chromophytes calibrées en laboratoire.

Un recalcul a été réalisé avec cette nouvelle SFS pour l'ensemble des espèces de chromophytes. Pour l'ensemble des espèces testées, la SFS calibrée permet d'augmenter la fraction de la [TChl a] attribuée aux chromophytes et de réduire considérablement la part attribuée aux chlorophytes (exemple de *Pseudo-nitzschia sp.*, Figure 16). Néanmoins cette différence n'est pas valable pour le Chl6 de toutes les espèces.

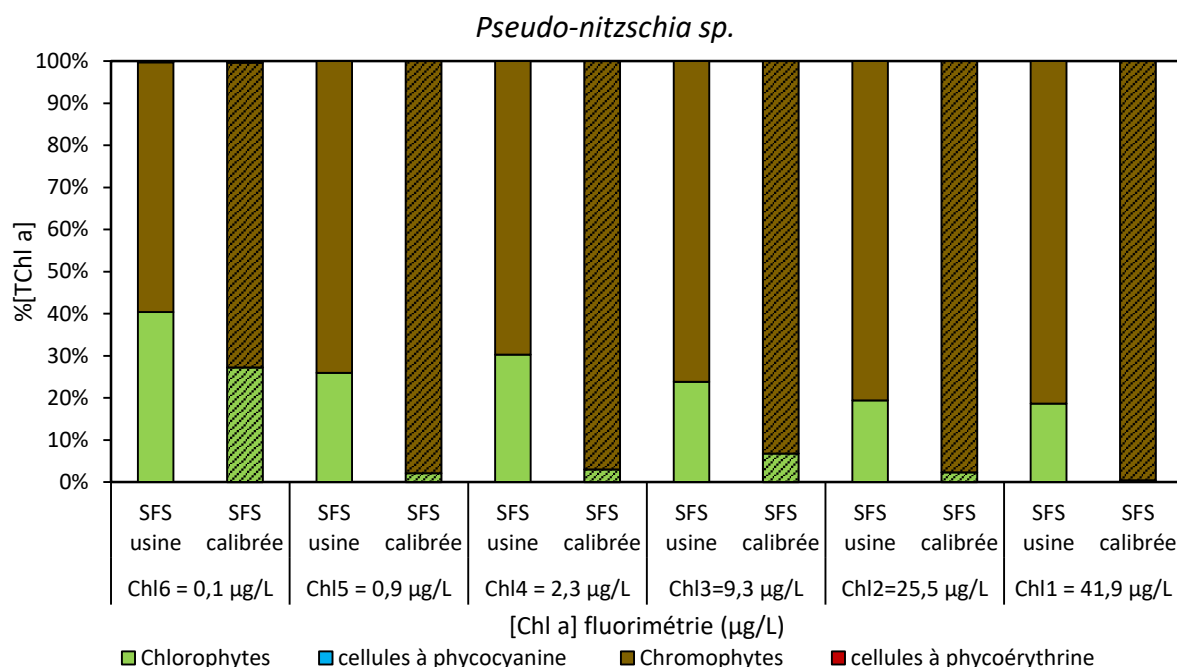


Figure 16 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour *Pseudo-nitzschia sp.* avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des chromophytes en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées par fluorimétrie.

Pour le groupe des chlorophytes, les tests en laboratoire sur *Tetraselmis sp.*, l'espèce d'eau de mer sélectionnée, ainsi que sur les 2 espèces d'eau douce *Chlamydomonas sp.* et *Desmodesmus sp.* avec la SFS usine ont montré de bons résultats révélant que la SFS usine est bien adaptée aux espèces en présence. Nous avons tout de même souhaité comparer les SFS de chacune des espèces afin d'observer d'éventuelles différences. Pour *Tetraselmis sp.* par exemple (Tab. 5), les intensités relatives de fluorescence sont similaires à celles pour la SFS usine. Il a ainsi été décidé de conserver la signature usine pour le groupe des chlorophytes.

Tableau 4 : Comparaison de la SFS usine des chlorophytes avec la SFS de *Tetraselmis sp.* calibrée en laboratoire.

longueur d'onde (nm)	Chlorophytes usine	<i>Tetraselmis sp.</i>
	Intensité relative de fluorescence	
370	1,835	1,931
470	2,669	3,579
525	0,436	0,441
570	0,133	0,116
590	0,668	0,648
610	0,723	0,567

Pour le groupe des cellules à phycocyanine, la moyenne des SFS calibrées pour chaque espèce est très proche de la SFS usine (Figure 17). La SFS calibrée présente néanmoins pour la LED à 610 nm une intensité relative de fluorescence intermédiaire entre le groupe des cellules à phycocyanine et celui des cellules à phycoérythrine. Cette observation permet d'expliquer la fraction de la [TChl a] qui est attribuée aux cellules à phycoérythrine pour les espèces du groupe cellules à phycocyanine.

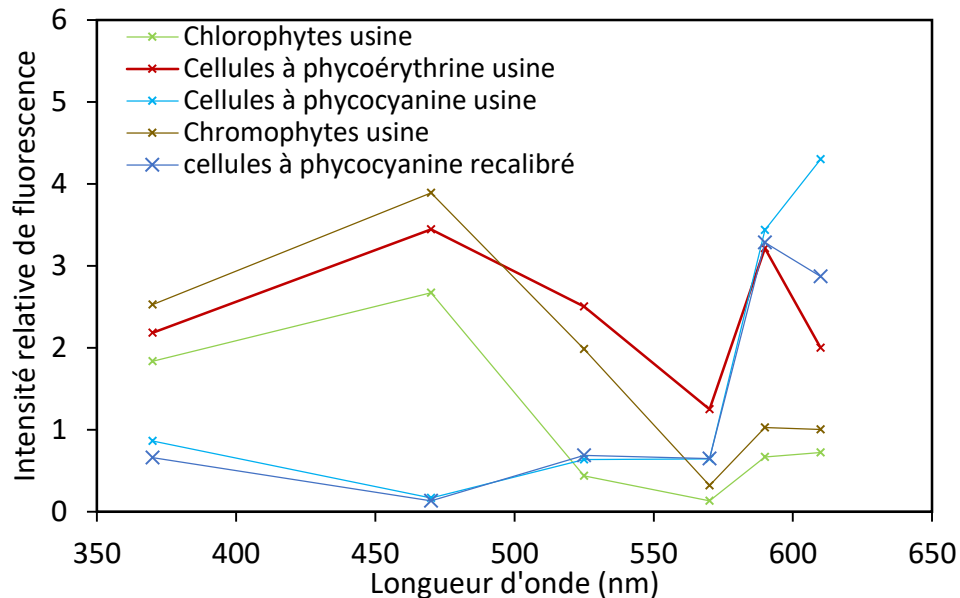


Figure 17 : Signatures Spectrales de Fluorescence usine pour les chlorophytes, cellules à phycocyanine et phycoérythrine et chromophytes, et nouvelle SFS pour les cellules à phycocyanine obtenue en moyennant les SFS des 2 espèces calibrées en laboratoire.

Un recalcul a été effectué pour les données des deux espèces de cyanobactéries riches en phycocyanine testées avec la nouvelle SFS définie pour le groupe des cellules à phycocyanine. Pour *Microcystis sp.* par exemple (Figure 18), le recalcul avec la nouvelle SFS n'est pas concluant. En effet, la fraction attribuée aux cellules à phycocyanine n'augmente que pour Chl4 et Chl3 (19.4 µg/L et 46.1 µg/L respectivement) et de façon très modérée (+5 % et +7 % respectivement). Par ailleurs, la fraction attribuée aux cellules à phycocyanine avec la SFS usine est pour partie réattribuée aux chlorophytes, ce qui est moins cohérents avec la composition pigmentaire des cyanobactéries (mélange de phycoérythrine et phycocyanine). Ainsi il a été décidé de conserver la SFS usine pour le groupe des cellules à phycocyanine.

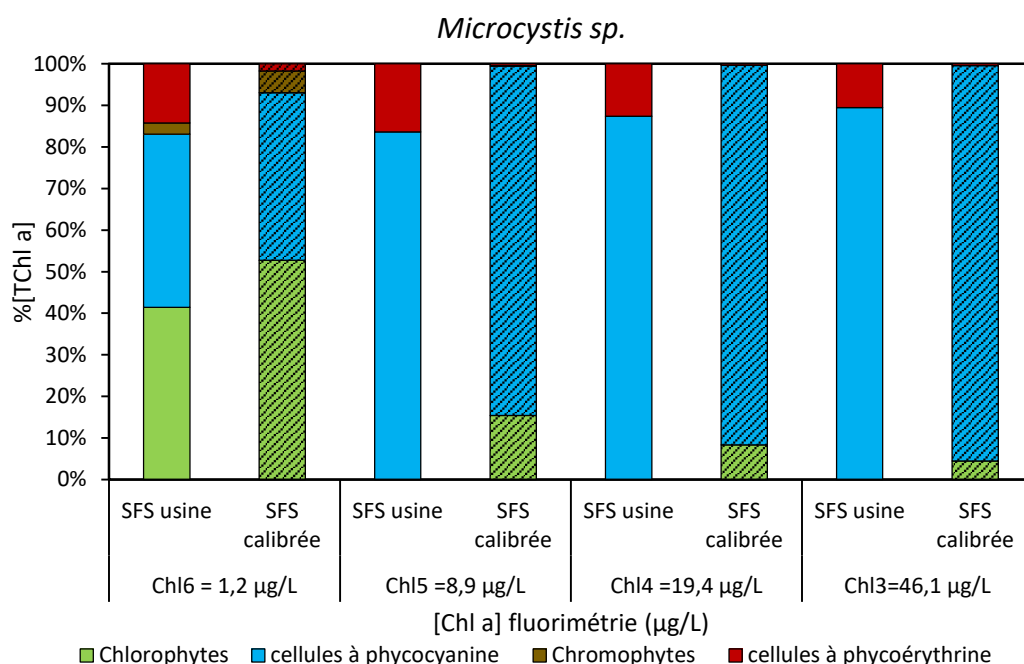


Figure 18 : Distribution des 4 groupes phytoplanctoniques pour *Microcystis sp.* avant (couleurs non rayées) et après recalcul (couleurs rayées) avec la nouvelle signature spectrale des cellules à phycocyanine en fonction des concentrations en Chlorophylle mesurées.

Nous aboutissons finalement à une signature de fluorescence spectrale avec la même signature que celle pré-définie en usine pour les groupes des chlorophytes, des cellules à phycocyanine et des cellules à phycoérythrine. Pour le FluoroProbe qui sera utilisé en eau de mer, seule la SFS du groupe des chromophytes a été adaptée aux espèces en présence et testées en laboratoire. Cette nouvelle matrice de SFS (Tableau 5) est cohérente avec l'assemblage phytoplanctonique rencontré en Baie de Seine qui est majoritairement composé de chromophytes. Cette nouvelle matrice de SFS sera testée sur les données *in situ* des campagnes de terrains afin de la valider pour son utilisation future.

Tableau 5 : Nouvelle matrice de signatures de fluorescence spectrale pour une utilisation avec la station de travail (jeu de paramètres « workstation ») adaptée à la Baie de Seine.

longueur d'onde (nm)	Chlorophytes	Chromophytes	Cellules à phycocyanine	Cellules à phycoérythrine
	Intensité relative de fluorescence			
370	1,835	2,069	0,864	2,183
470	2,669	4,054	0,168	3,444
525	0,436	1,802	0,634	2,504
570	0,133	0,227	0,645	1,250
590	0,668	0,790	3,435	3,215
610	0,723	0,598	4,298	1,998

## 1.4. Effet de la turbidité sur les performances du fluoroprobe

La baie et l'estuaire de la Seine sont des zones qui présentent de fortes concentrations en matière en suspension (MES) et des turbidités particulièrement élevées. Le FluoroProbe qui sera installé sur la bouée SCENE en particulier (Station « La Carosse ») sera soumis à de fortes variations de turbidité, pouvant potentiellement impacter les mesures de fluorescence et donc l'estimation de la [TChl a] et de la distribution des groupes phytoplanctoniques.

Pour étudier l'impact de la turbidité sur les performances du fluoroprobe, de la vase prélevée en Baie de Seine a été lyophilisée et conservée dans une étuve à 50 °C. Pour chaque espèce, cette vase a été ajoutée (poids de vase sèche au µg dans un d'échantillon de volume connu) à la gamme de [Chl a] afin d'obtenir pour une [Chl a] donnée une gamme de concentration en MES. Pour chaque échantillon, le même protocole de mesure que pour la Chl a a été utilisé (50 mesures par échantillon et triplicats, cf. partie 1.2.) permettant d'estimer la [TChl a], la distribution des groupes phytoplanctoniques ainsi que la transmission.

### 1.4.1. Effet de la turbidité sur l'estimation de la concentration en chlorophylle a

Pour le groupe des chromophytes, les espèces de diatomées et haptophytes testées présentent une diminution de la [TChl a] avec l'augmentation de la [MES]. Pour *Asterionellopsis glacialis* par exemple (Figure 19), on observe une diminution de 13 % de la [TChl a] entre [MES]=0 mg/L et 250 mg/L. Ces observations ne sont cependant pas valables pour les deux espèces de dinoflagellées testées (exemple de *Prorocentrum sp.*, Figure 20), qui au contraire présentent soit une augmentation de la [TChl a] avec l'augmentation de la [MES]. pour *Prorocentrum sp.* (de 24 % de la [TChl a] entre [MES]=0 mg/L et 186 mg/L), soit des valeurs stables pour *Gymnodinium sp.*.

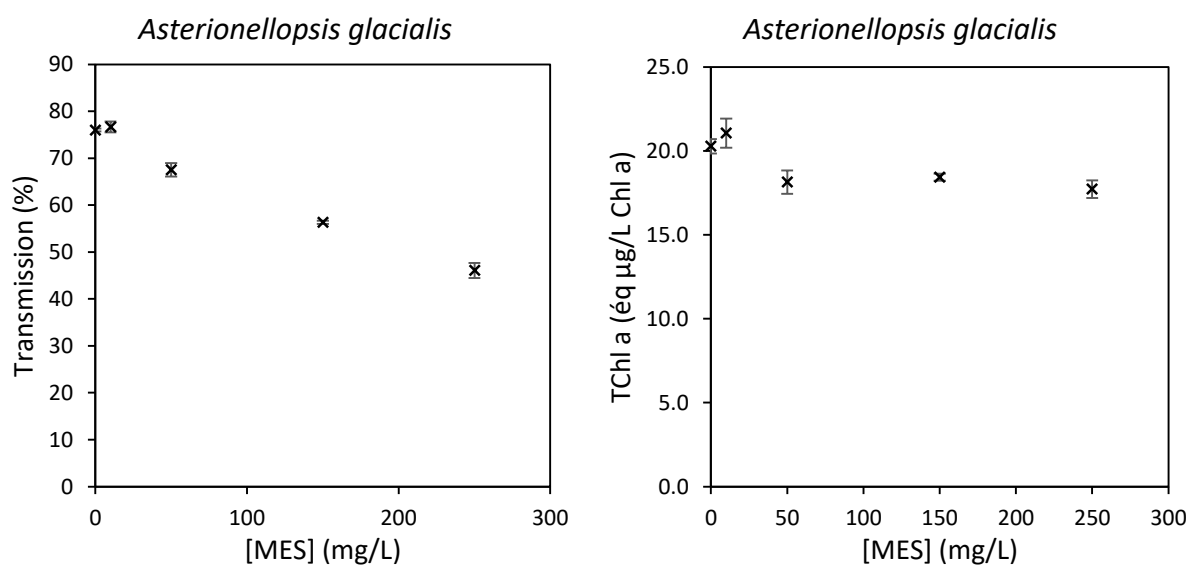


Figure 19 : Evolution a) de la transmission (en %) et de la concentration en Chl a totale (en équ µg/L de Chl a) en fonction de la concentration en matière en suspension (en mg/L) pour un échantillon de *Asterionellopsis glacialis*.

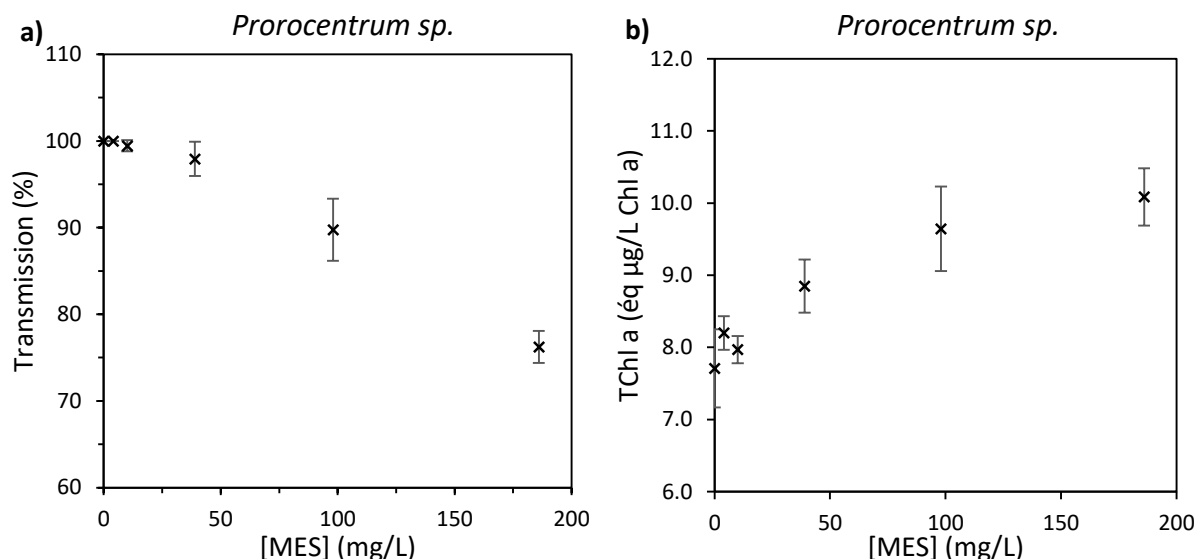


Figure 20 : Evolution a) de la transmission (en %) et b) de la concentration en Chl a totale (en équivalent µg/L de Chl a) en fonction de la concentration en matière en suspension (en mg/L) pour un échantillon de *Prorocentrum sp.*.

Pour les chlorophytes, la [TChl a] reste constante avec l'augmentation de la [MES], par exemple pour *Tetraselmis sp.*, avec une augmentation de la [MES] de 0 à 192.5 mg/L la [TChl a] varie entre  $4.18 \pm 0.20 \mu\text{g/L}$  et  $5.50 \pm 0.43 \mu\text{g/L}$ .

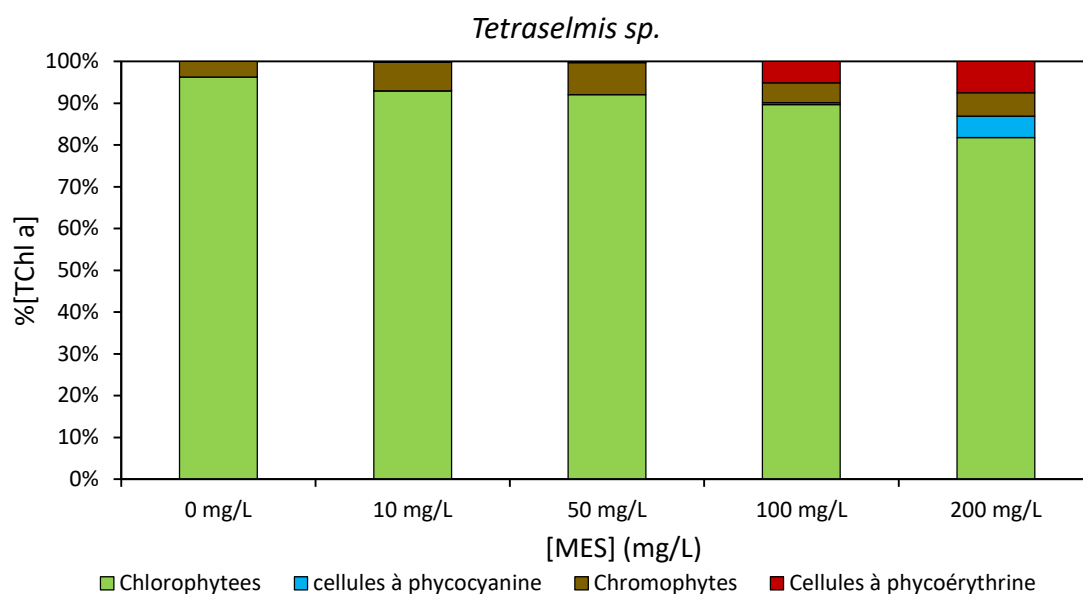
Pour les cellules à phycocyanine, alors que *Anabaena cylindrica* présente une [TChl a] constante avec l'augmentation de la [MES], *Microcystis aeruginosa* voit sa [TChl a] qui augmente de façon modérée (de  $19.85 \pm 1.74 \mu\text{g/L}$  à  $16.16 \pm 0.19 \mu\text{g/L}$  pour une [MES] de 0 à 161.3 mg/L).

Enfin pour les cellules à phycoérythrine, représentées par *Synechococcus sp.*, la [TChl a] ne semble pas affectée par l'augmentation de la [MES].

Dans la mesure où comme montré précédemment l'estimation de la [TChl a] en conditions optimales (c'est-à-dire monoculture avec une [MES] = 0 mg/L) est plus ou moins surestimée par le FluoroProbe selon les espèces, l'impact de la turbidité sur l'estimation de la [TChl a] pour certaine espèce est à nuancer.

#### 1.4.2. Effet de la turbidité sur la distribution de la concentration en chlorophylle a entre les 4 groupes phytoplanctoniques

On observe pour le groupe des chlorophytes, une diminution de la fraction de la [TChl a] attribuée aux chlorophytes par le FluoroProbe lorsque la [MES] augmente (de 96 à 92 % pour [MES] de 0 à 200 mg/L pour *Tetraselmis sp.* par exemple, Figure 21). Cette diminution profite en particulier aux groupes des cellules à phycocyanine et à phycoérythrine qui voient leur fraction passée de 0 à 5 % et 0 à 7 % respectivement. Ces observations sont valables aux différentes [Chl a] testées et pour les différentes espèces aussi bien d'eau de mer que d'eau douce.



*Figure 21 : Distribution (en % de la concentration en Chl a totale) entre les chlorophytes, les chromophytes, et cellules à phycocyanine et phycoérythrine estimée avec le FluoroProbe pour une culture de Tetraselmis sp. de concentration en Chl a estimée avec le FluoroProbe à  $9.7 \pm 0.64$   $\mu\text{g/L}$  de Chl a et une gamme de concentration en MES.*

Pour les chromophytes, les différentes espèces de diatomées, haptophytes et dinoflagellées testées ne présentent pas de modifications significatives de leur distribution entre les différents groupes lorsque la [MES] augmente.

De même, pour les cellules à phycocyanine et à phycoérythrine les espèces testées présentent une distribution similaire quelle que soit la quantité de MES ajoutée.

## 2. Mesures *in situ* avec le FluoroProbe pendant les campagnes PHRESQUES

### 2.1. Campagnes PHRESQUES

Des mesures *in situ* ont été réalisées avec les FluoroProbes lors des 4 campagnes PHRESQUES. Ces campagnes se sont déroulées à bord du navire océanographique Côte de la Manche, du 5 au 12 février 2017 pour le Leg 1, du 11 au 17 avril 2017 pour le Leg 2, du 23 au 30 juin 2017 pour le Leg 3, et du 07 au 11 octobre 2017 pour le Leg 4.

Au cours de ces campagnes 4 stations de mesures et prélèvements ont été suivies (Figure 22) : SMILE à proximité de la bouée instrumentée SMILE, La Carosse à proximité de la bouée instrumentée SCENES, BS1 au large de SMILE, et Fatouville au niveau de l'estuaire.

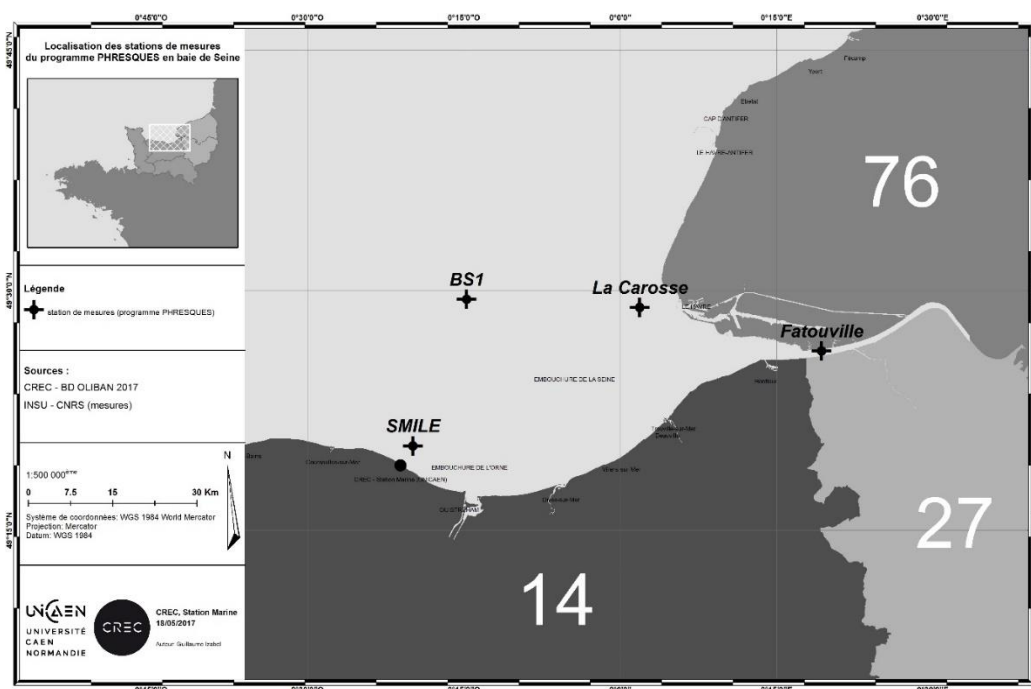


Figure 22 : Localisation des stations de mesures et prélèvements suivies dans le cadre du projet PHRESQUES.

En parallèle des mesures avec les FluoroProbes, des mesures ont été faites avec une MonitBox – Bionef (Figure 23) pour la turbidité, la salinité et la température, ainsi que pour les mêmes paramètres (concentration en chlorophylle a, classes algales avec en supplément l'activité photosynthétique) que le FluoroProbe grâce à un AOA (AlgaeOnlineAnalyser).





Figure 23 : MonitBox – Bionef.

A chaque station, des échantillons ont été prélevés en surface et au fond sur des cycles de 12h pour estimer la [Chl a] par fluorimétrie ainsi que la composition pigmentaire par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) pour confrontation avec les mesures du FluoroProbe.

## 2.2. Mesures de surface haute-fréquences

La dynamique du phytoplancton a été suivie avec un FluoroProbe à chaque station en surface (environ 1 m de profondeur) sur un cycle de marée (12h). Le FluoroProbe a été placé sur une perche sur le plat-bord du bateau (Figure 24). Le tuyau de prélèvement de la MonitBox – Bionef a été installé en parallèle sur la perche avec un prélèvement au même niveau que la fenêtre de mesure du FluoroProbe.

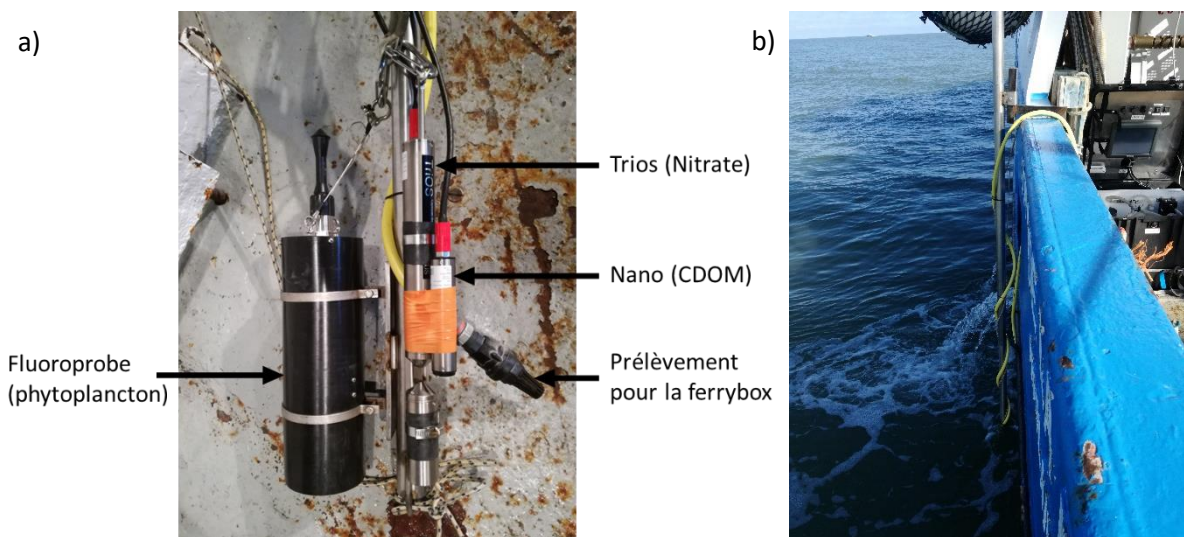


Figure 24 : a) Installation des instruments de mesure sur la perche ; b) positionnement de la perche sur le plat-bord du bateau.

Le FluoroProbe a été programmé pour faire une mesure toutes les 3 minutes (« Measurement interval », Tableau 1Tableau 6) et s'éteindre après chaque mesure (« Power-down after measurement » sur « on ») afin d'économiser la batterie.

Tableau 6 : Paramètres communs utilisés pour les mesures haute-fréquences in situ.

Name	Value	Unité
Warm-up time	5	s
Measurement interval	180	s
Number of measurements	1	
LED measuring time	20	1/10s
Measuring type	continuous	
Measurement time	20	1/10s
Send results	on	
Power-down after measurement	on	
Store results	on	
Start measurement on power-up	on	
Enter comment at start of measurement	on	
Air pressure from first measurement	off	
Calculate concentrations after each measurement	on	
Serial number	2359	
Software version	265	
Name of parameter set	Standard	

Des difficultés ont été rencontrées lorsque le mode « Power-down after measurement » est sur « on » pour décharger les données avec le système plug + clef usb. En effet, aucune procédure n'est précisée dans le manuel d'utilisation du fluoroprobe. Lorsque le transfert avec le plug+usb échouait une solution consistait à brancher directement la sonde à un ordinateur en se rendant sur le logiciel bbe et à faire un « get data ».

## 2.3. Instabilité du FluoroProbe dans l'estimation de la chlorophylle a en haute-fréquence

### 2.3.1. Estimation de la chlorophylle a totale

A la station SMILE lors du Leg 4, jusqu'à environ 17h30 les [TChl a] mesurées par le FluoroProbe à environ 1 m de profondeur présentent de fortes variations (avec une amplitude d'environ 2 µg/L ; Figure 25). A cette profondeur, le phytoplancton est exposé en journée aux rayonnements solaires induisant un phénomène de quenching photochimique. Lorsque le rayonnement solaire diminue avec la tombée de la nuit (autour de 18h00 le 08 octobre 2017) le quenching photochimique devient moindre et les mesures du FluoroProbe sont plus stables.

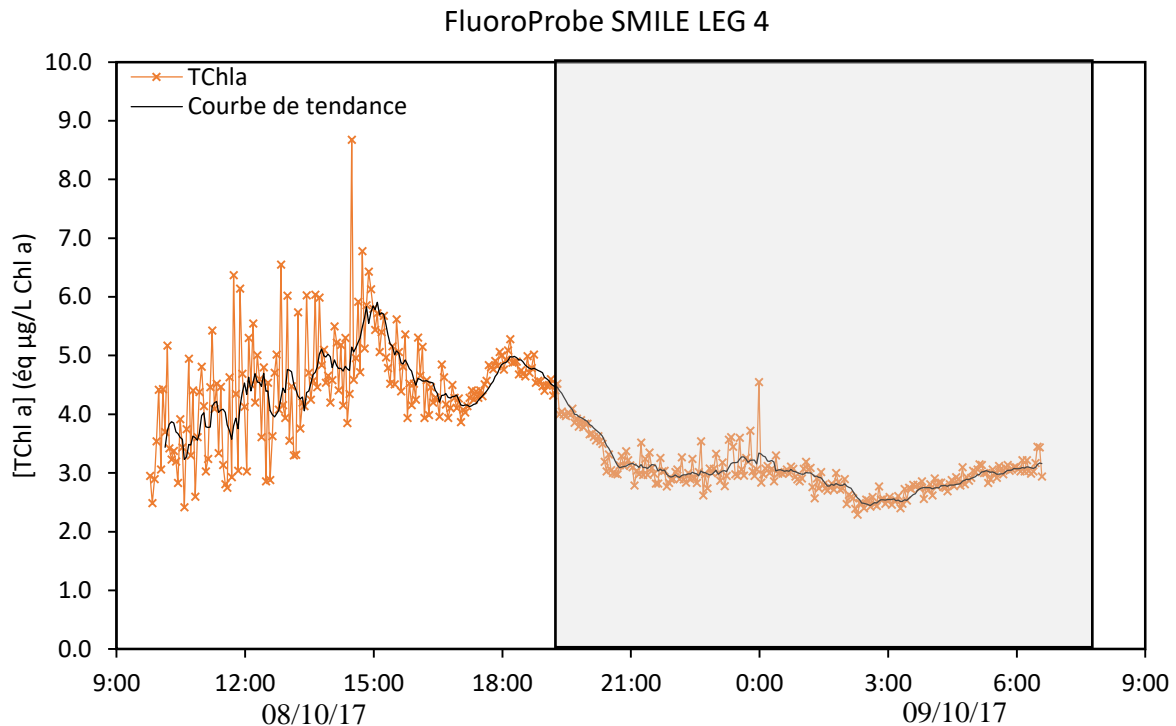


Figure 25 : Concentration en chlorophylle a totale (en équivalent  $\mu\text{g/L}$  de Chl a) mesurée avec le FluoroProbe à la station SMILE les 08 et 09 octobre 2017 (Leg 4).

Cette instabilité dans la mesure de la [TChl a] avec le FluoroProbe est observée quelle que soit la saison (lors des 4 campagnes), aux stations SMILE, BS1 et La Carosse. A Fatouville les variations dans la mesure de la [TChl a] sont nettement atténuées et présentent une amplitude plus faible (Figure 26). Cette observation pourrait être attribuée à la forte turbidité rencontrée à Fatouville (par exemple jusqu'à 66 fois supérieure à celle des autres stations lors du Leg 1; Figure 27) qui diminue fortement la lumière incidente à la profondeur de mesure. Le phytoplancton étant moins exposé au rayonnement solaire, le quenching photochimique serait moins important, induisant des mesures plus stables.

Les FluoroProbes devant être installés dans des puits sur les bouées, le phytoplancton devrait être moins exposé aux rayonnements solaires permettant ainsi d'obtenir une meilleure stabilité dans les mesures haute-fréquences. Il faudra veiller, en rapport avec l'énergie disponible, à garder une fréquence de mesure la plus élevée possible afin de lisser les données et d'avoir une vision plus précise de l'évolution de la [TChl a] sur de longues périodes de mesures.

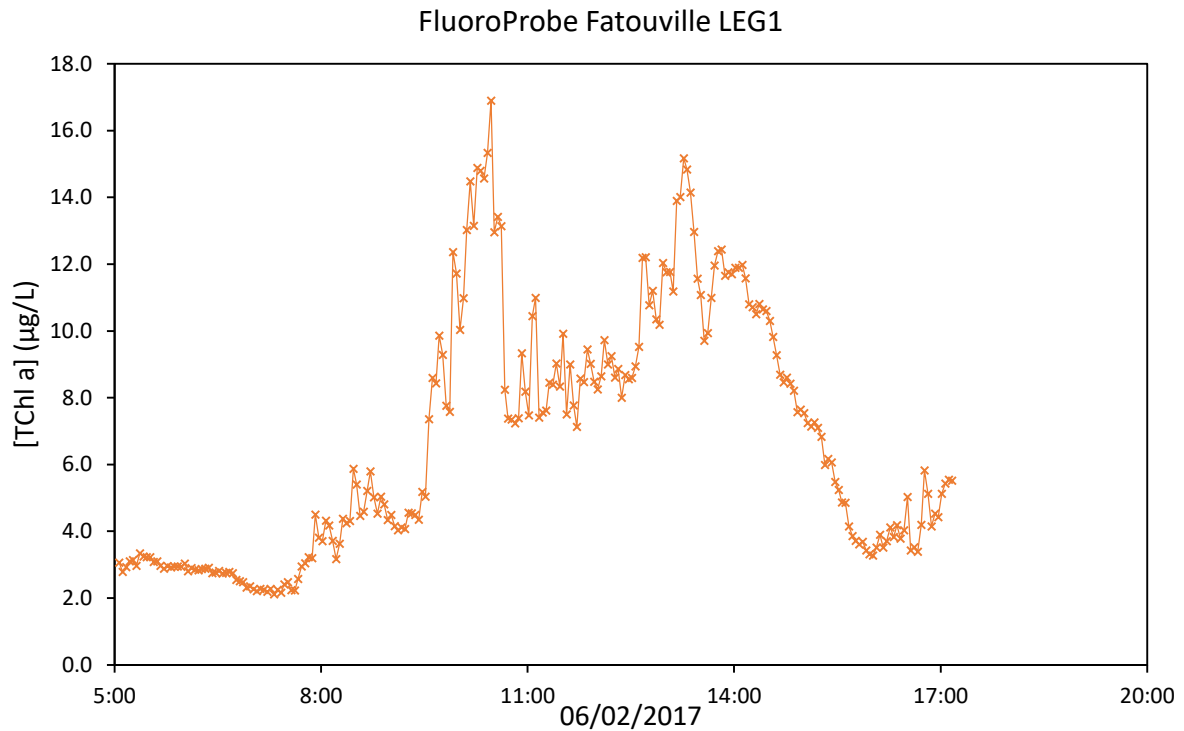


Figure 26 : Concentration en chlorophylle a totale (en équivalent µg/L de Chl a) mesurée avec le FluoroProbe à la station Fatouville le 06 février 2017 (Leg 1).

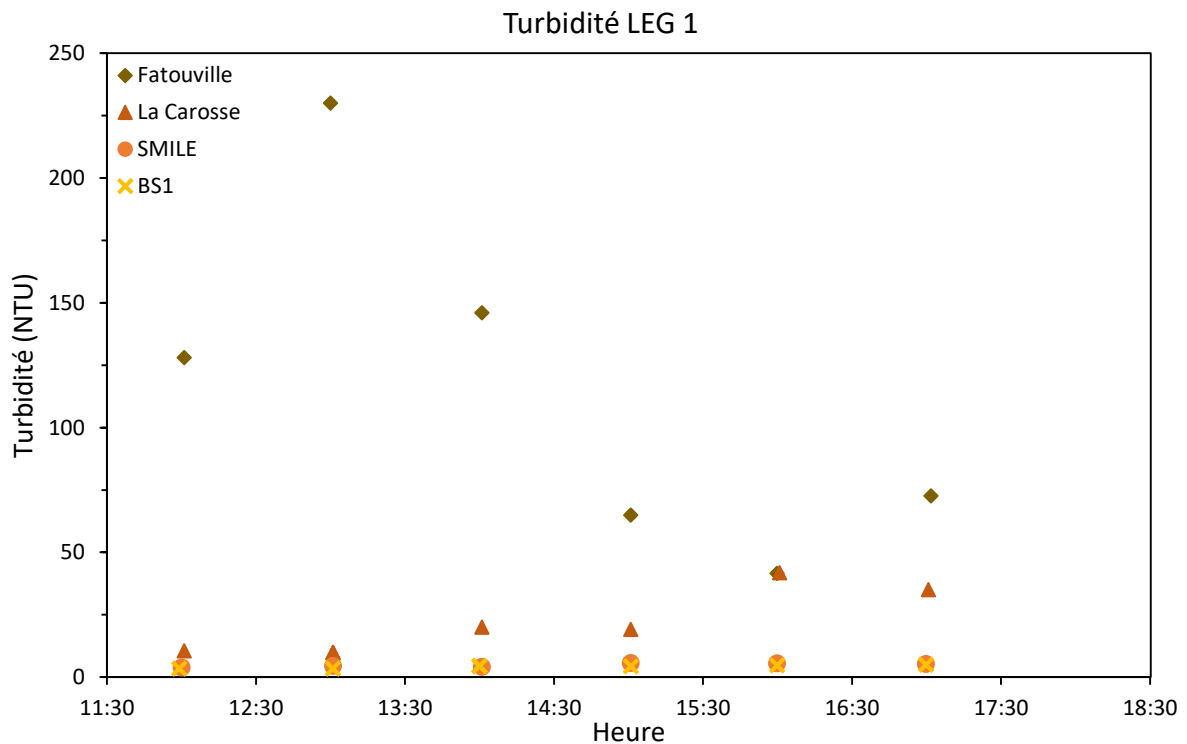
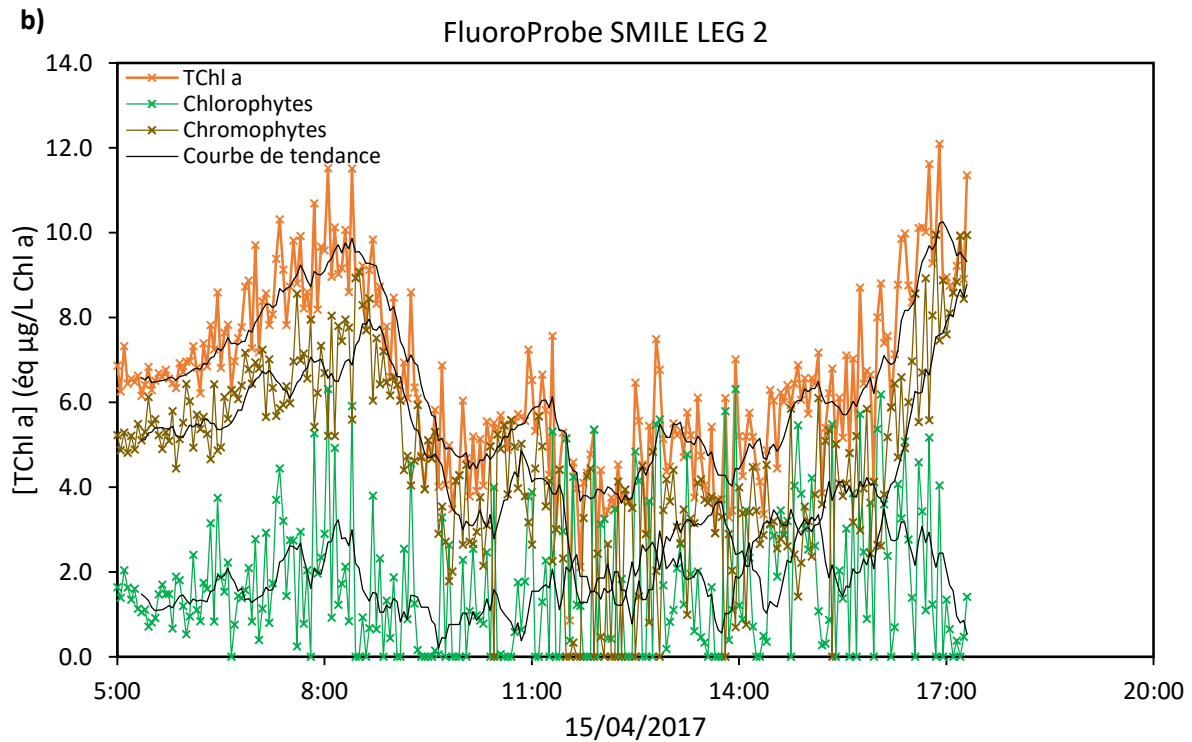
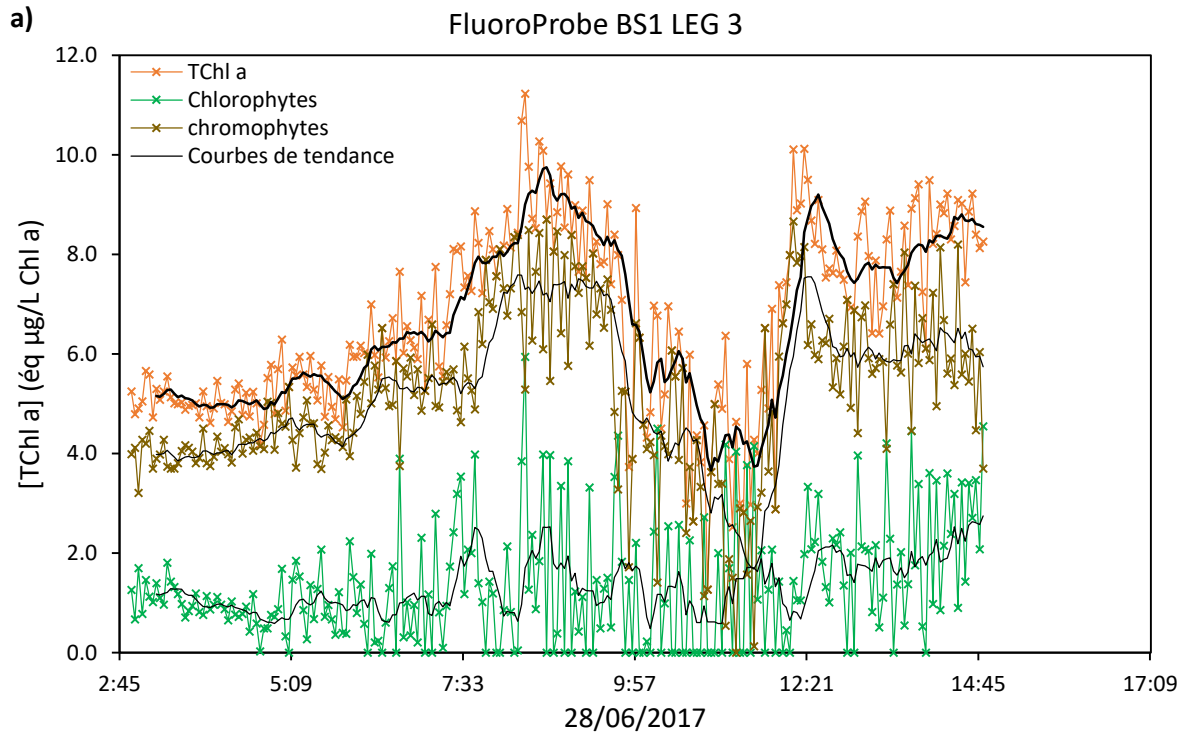


Figure 27 : Turbidité mesurée avec un turbidimètre de laboratoire HACH 2100N IS (Ifremer) lors du Leg 1 (6 au 11 février 2017) aux stations Fatouville, La Carosse, SMILE et BS1.

### 2.3.2. Distribution des groupes phytoplanctoniques

L'instabilité de l'estimation de la [TChl a] avec le FluoroProbe se retrouve dans l'estimation de la concentration de l'ensemble des groupes phytoplanctoniques (par exemple à BS1 le 28 juin 2017; Figure 28-a). De la même manière que pour la [TChl a], ces instabilités sont moindres à Fatouville (Figure 28-d).



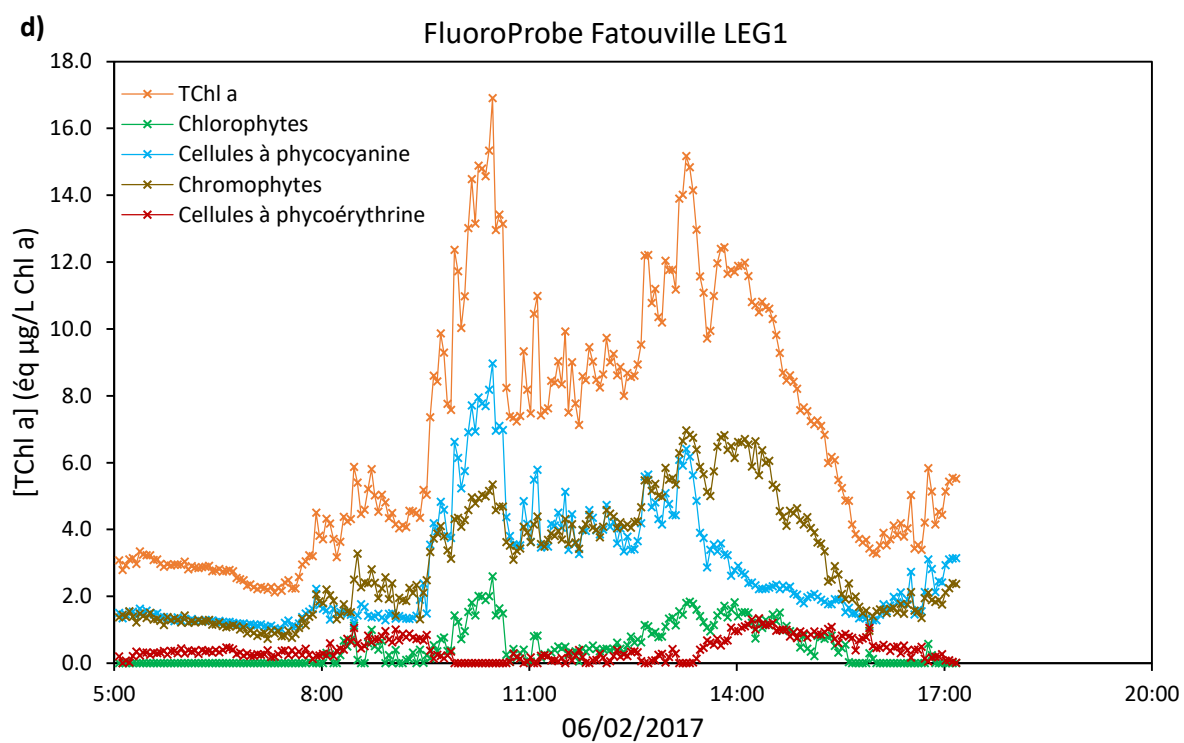
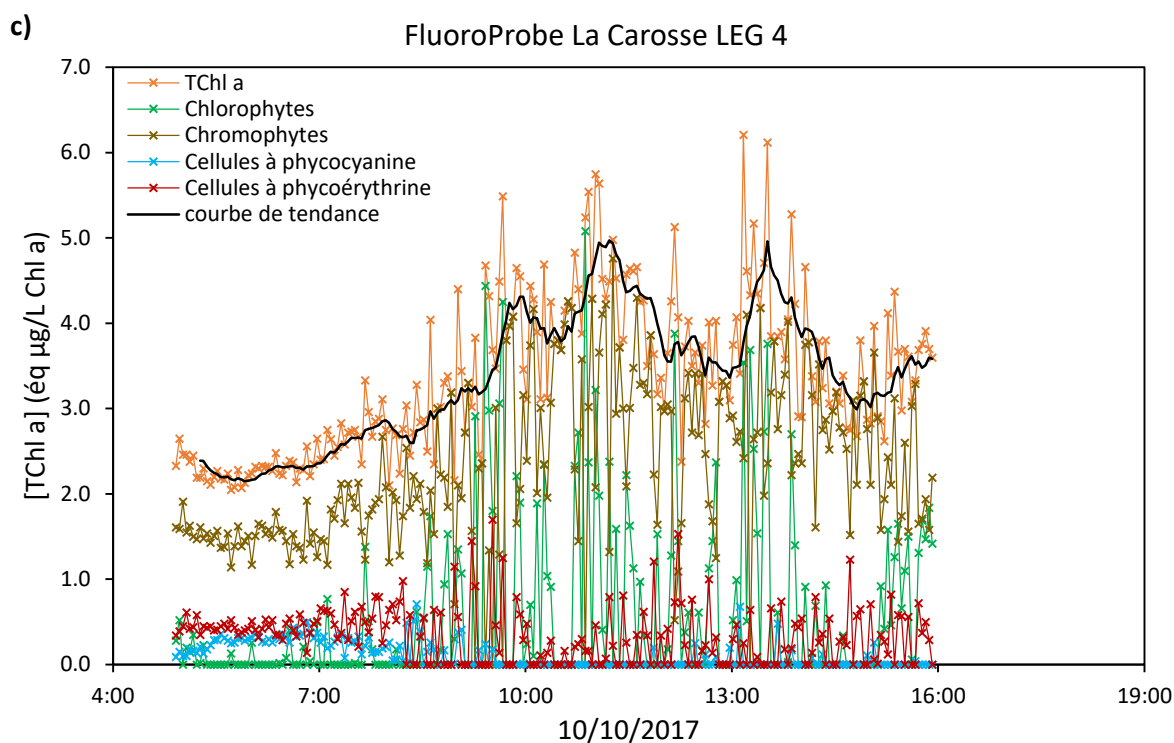


Figure 28 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en éq µg/L Chl a) entre les 4 groupes phytoplanctoniques a) le 28 juin 2017 à la station BS1 (Leg 3) b) le 15 avril 2017 à la station SMILE (Leg 2) c) le 10 octobre 2017 à la station station La Carosse (Leg 4) et d) le 06 février 2017 à la station Fatouville (Leg 1).

Comme expliqué lors de la calibration du FluoroProbe sur des cultures, la fraction de la [Tchl a] attribuée aux chlorophytes est pour partie un artefact liée à la calibration d'usine. Phénomène auquel s'ajoute lors des mesures *in situ* du quenching photochimique perturbant la mesure, en particulier pour les chlorophytes (Figure 28-a par exemple) qui présentent une plus forte amplitude de variations. Malgré ce biais avec la calibration usine, le FluoroProbe permet de discriminer la présence de micro-algues riches en phycocyanine et en phycoérythrine comme observé à La Carosse et Fatouville (respectivement Figure 28-c et d) qui sont sous plus forte influence de la Seine que SMILE et BS1. On note en effet lors de mesures réalisées à Poses avec le FluoroProbe (Figure 29) la présence de l'ensemble des groupes phytoplanctoniques en quantités similaires (environ 1µg/L) pour les micro-algues riches en phycocyanine, les chlorophytes et les cellules à phycoérythrine, avec une prédominance (concentration environ 2 fois supérieure) pour les chlorophytes.

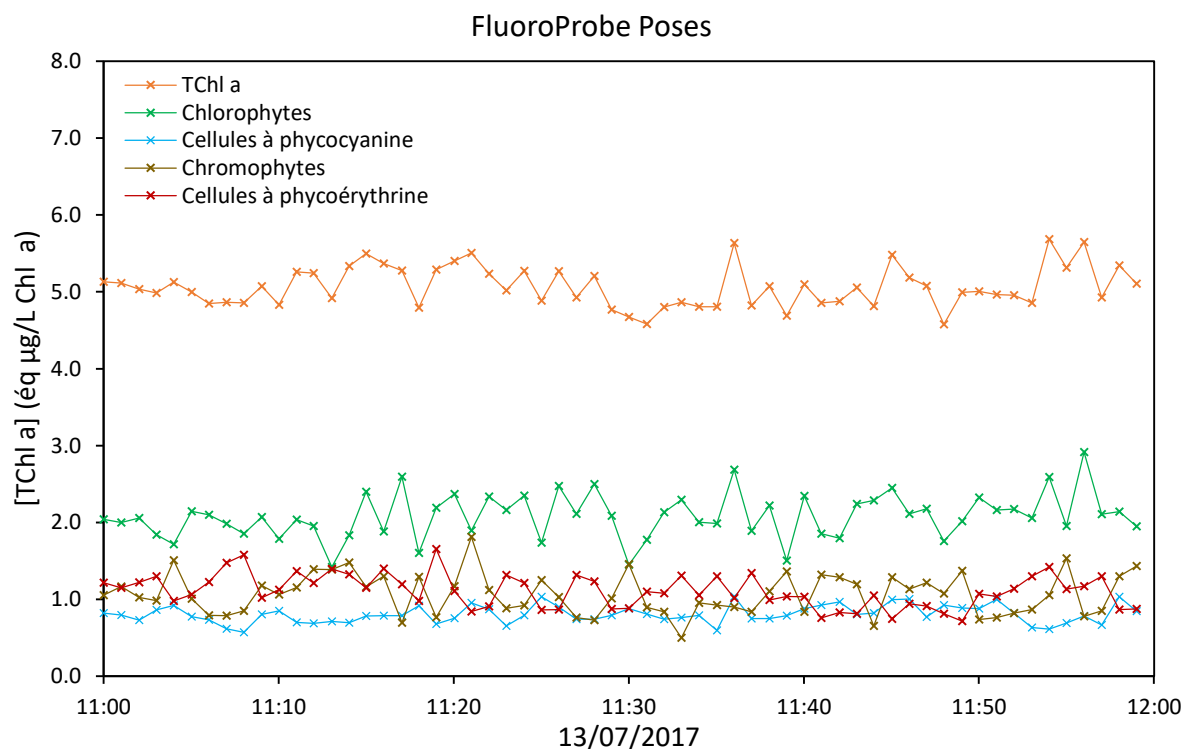


Figure 29 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en eq µg/L Chl a) entre les 4 groupes phytoplanctoniques à Poses le 13/07/17.

Des échantillons pour le dénombrement et l'identification des cellules phytoplanctoniques ont été prélevés et conservés à chaque station selon le protocole SOMLIT<sup>1</sup>. Ces échantillons devraient être traités avec un cytomètre en flux de type « CytoSense » (CytoBuoy b.v). En plus de dénombrer les cellules nano- et pico-phytoplanctoniques, le CytoSense permet de dénombrer le micro-phytoplancton et d'identifier (au genre) les différentes cellules<sup>2</sup>. Ces analyses permettront de valider la distribution des groupes phytoplanctoniques obtenues lors des mesures *in situ* pendant les campagnes.

<sup>1</sup> Salter, I., Garcia, N., Rigaut-Jalabert, F., Gregori, G. et Marie, D., version 2015. « Prélèvement, Fixation, Stockage et Envoi des échantillons pour analyse du paramètre « pico-nanoplancton » par cytométrie en flux ».

<sup>2</sup> Dubelaar, G.B.J., Geerders, P.J.F., Jonker, R.R., 2004. High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. J. Environ. Monit. 6, 946e952.

## 2.4. Comparaison des données de FluoroProbe avec celles de l'AOA et de fluorimétrie

Les mesures du FluoroProbe sont comparées à celles de l'AOA et aux concentrations en chlorophylle *a* estimées par fluorimétrie en laboratoire afin d'évaluer ses performances en milieu naturel (distribution et estimation de la TChl *a* respectivement).

Les mesures *in situ* de [TChl *a*] avec le FluoroProbe et l'AOA (dans la MonitBox – Bionef) présentent des tendances très similaires (par exemple à La Carosse lors du Leg 3 ; Figure 30). Alors que les mesures réalisées avec le FluoroProbe montrent une instabilité importante (quenching photochimique), les mesures réalisées avec l'AOA sont stables avec une très faible amplitude de variation. Au contraire du FluoroProbe où le phytoplancton est exposé aux rayonnements solaires, l'échantillon prélevé par la MonitBox – Bionef reste à l'obscurité avant passer dans la cellule de mesure de l'AOA, réduisant ainsi le quenching photochimique. L'estimation de la [TChl *a*] avec l'AOA est ainsi plus fiable que celle avec le FluoroProbe. Cependant, avec une fréquence de mesure suffisamment importante (ici une mesure toutes les 3 minutes) sur de longues périodes (comme préconisé précédemment), le FluoroProbe permet de reproduire de façon satisfaisante l'évolution de la concentration en [TChl *a*] obtenue avec un instrument plus performant (mais moins adapté à l'installation sur une bouée instrumentée).

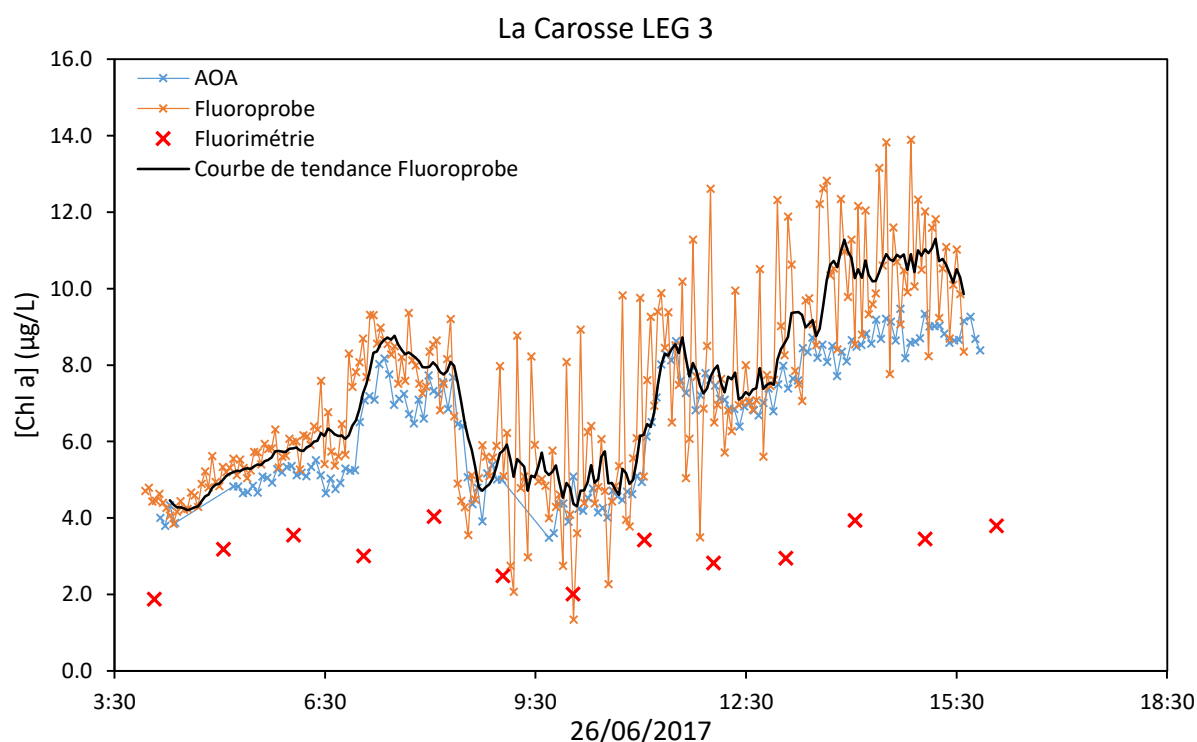


Figure 30 : Mesure de la concentration en chlorophylle *a* totale avec le FluoroProbe et l'AOA à la station La Carosse le 26 juin 2017 (Leg 3).

En parallèle des mesures *in situ* avec les différents instruments, des prélèvements d'eau ont été réalisés en surface (environ 1 m de profondeur) et à 2 m du fond avec une bouteille niskin verticale pour l'analyse de la Chl *a* par fluorimétrie. Les mesures et prélèvements ont été



réalisés selon la méthode SOMLIT<sup>3</sup> avec un *Turner Designs Trilogy*. La fluorimétrie est une méthode d'analyse standard qui est une des plus couramment utilisée pour la détermination de la concentration en Chl *a*. Comme pour les expérimentations en laboratoire avec les cultures, le FluoroProbe surestime les [TChl *a*]. On retrouve la même tendance dans l'évolution de la [TChl *a*], cependant de par les fortes variations liées au quenching photochimique avec le FluoroProbe la comparaison point à point (à l'heure du prélèvement pour la fluorimétrie) n'est pas concluante. Il est ainsi difficile de fournir un facteur de conversion entre la [Chl *a*] mesurée *in situ* avec le FluoroProbe et celle mesurée par fluorimétrie.

## 2.5. Recalcul des données de campagne avec une nouvelle matrice de Signatures de fluorescence spectrale

Avant d'être utilisée pour réviser les données des campagnes, la nouvelle matrice de signatures de fluorescence spectrale issue des calibrations en laboratoire doit être adaptée. En effet, le jeu de paramètres (y compris les SFS) pour l'utilisation du FluoroProbe en laboratoire avec la station de travail diffère de celui pour l'utilisation de la sonde *in situ*. Afin de pouvoir utiliser la calibration des SFS réalisée en laboratoire, les matrice des SFS des jeux de données « workstation » (pour la station de travail) et « standard » (pour les mesures *in situ*) ont été comparées. Pour chaque groupe phytoplanctonique et pour chaque longueur d'onde un facteur de conversion a été calculé. Une nouvelle matrice « standard » a ainsi été définie en multipliant chaque SFS de la nouvelle matrice « workstation » par les facteurs de conversion correspondant (Tableau 7).

Tableau 7 : Nouvelle matrice de signatures de fluorescence spectrale pour une utilisation avec la station de travail (jeu de paramètres « standard ») adaptée à la Baie de Seine.

longueur d'onde (nm)	Chlorophytes	Chromophytes	Cellules à phycocyanine	Cellules à phycoérythrine
	Intensité relative de fluorescence			
370	0,959	1,055	0,462	1,176
470	2,267	3,419	0,153	3,053
525	0,435	1,713	0,588	2,157
570	0,117	0,215	0,605	1,113
590	0,575	0,676	3,049	2,564
610	0,612	0,494	3,767	1,504

Cette nouvelle matrice de SFS a ensuite été utilisée pour recalculer les proportions de la [TChl *a*] attribuée à chaque groupe phytoplanctonique pour les données de campagne. A SMILE lors du LEG 3 par exemple (Figure 31), on note qu'avec la nouvelle matrice de SFS calibrées la fraction de chlorophytes est réduite (en moyenne de 25 % de la [TChl *a*] à 14 %) au profit des chromophytes (qui passe en moyenne de 69 % de la [TChl *a*] à 75 %). La nouvelle matrice ne permet cependant pas de compenser le phénomène de quenching photochimique.

<sup>3</sup> Billy I., Oriol L., Mousseau L. et Passafiume O., version 2015. Détermination de la chlorophylle a par fluorimétrie

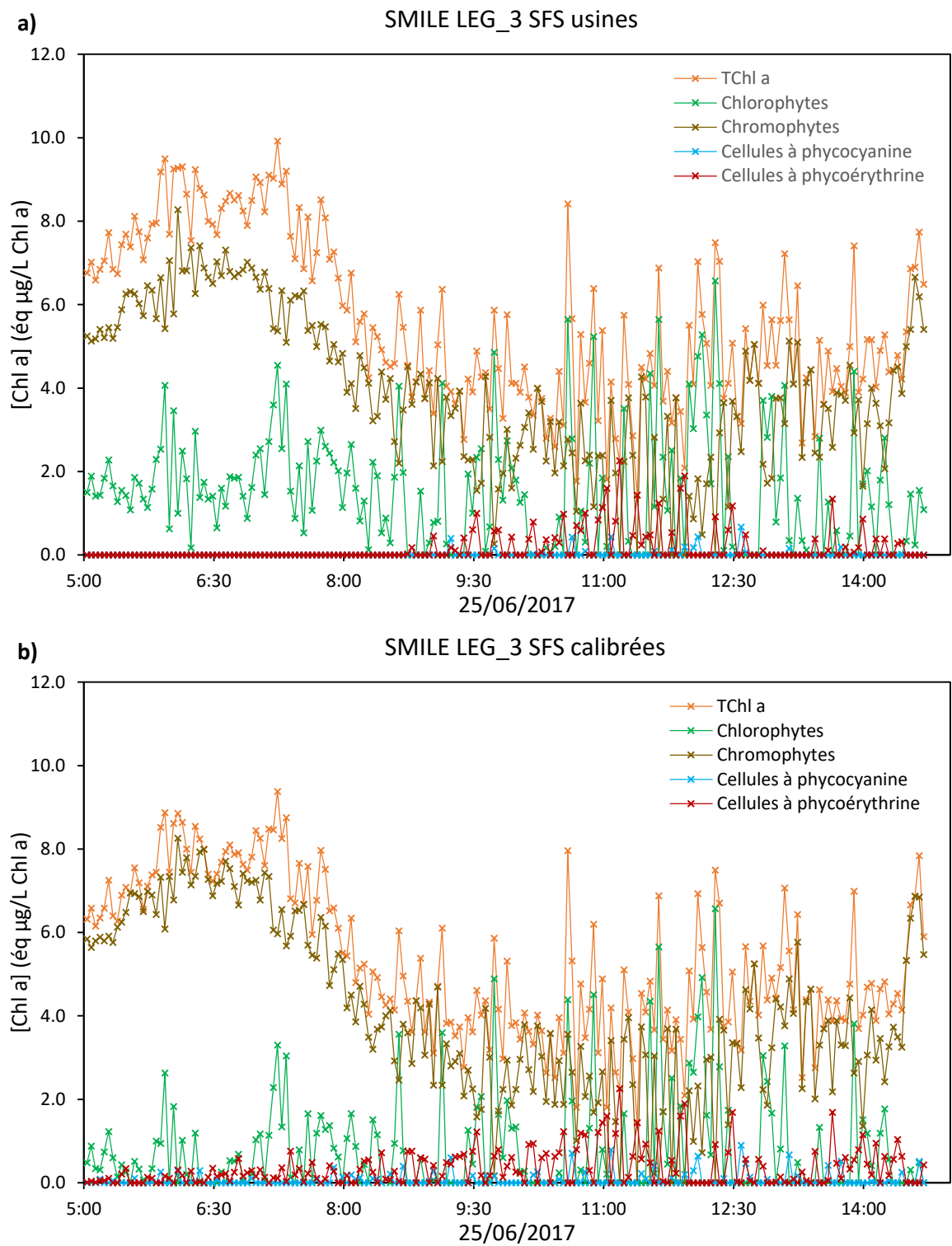


Figure 31 : Distribution de la concentration en chlorophylle a (en  $\text{eq } \mu\text{g/L Chl a}$ ) entre les 4 groupes phytoplanctoniques le 25 juin 2017 à la station SMILE (Leg 3) a) avec les signatures de fluorescence spectrale usines b) avec les signatures de fluorescence spectrale calibrées en laboratoire.

Pour la station de Fatouville où le quenching photochimique est plus limité en raison de la turbidité, la fraction attribuée aux chlorophytes passe d'en moyenne 10 % avec les SFS usines à 0 % avec les SFS calibrées. Cependant, cette diminution profite en majeure partie non pas aux

chromophytes mais aux cellules à phycocyanine dont la fraction attribuée passe d'en moyenne 16 % avec les SFS usines à 22 % avec les SFS calibrées. Cette observation reste cohérente, Fatouville étant dans l'estuaire et donc fortement soumis aux apports d'eau douce de la Seine.

### 3. Conclusion

Une gamme de concentrations en chlorophylle *a* a été réalisée à partir de cultures de souches phytoplanctoniques appartenant aux 4 groupes identifiés par le FluoroProbe. Cette gamme a été utilisée pour évaluer les performances du FluoroProbe dans l'estimation de la chlorophylle *a* totale de l'échantillon d'une part et dans la distribution de cette Chl *a* entre les groupes phytoplanctoniques identifiés.

Ces mesures en laboratoire, bien qu'en conditions favorables (monocultures sans ajout de matière en suspension), ont permis de mettre en évidence une surestimation de la concentration en chlorophylle *a* par le FluoroProbe (Chlorophylle *a in vivo*) en comparaison de mesures réalisées sur de la chlorophylle extraite (avec un fluorimètre de paillasse). Il a été impossible de définir un facteur de correction spécifique à chaque groupe phytoplanctonique car le facteur de correction varie en fonction de l'espèce. Cependant la réponse du FluoroProbe est linéaire, permettant ainsi de suivre l'évolution de la biomasse phytoplanctonique totale.

En condition optimale de mesure (monoculture en laboratoire), la précision du FluoroProbe devient satisfaisante (inférieure à 5 %) pour des concentrations en Chl *a* comprise entre 1 et 9 µg/L pour une mesure de référence réalisée avec un fluorimètre sur de la chlorophylle extraite. Les mesures réalisées en laboratoire avec différentes concentrations de MES montrent que l'augmentation de la turbidité affecte de manière variée les résultats en fonction des espèces testées mais ne remet pas en cause l'utilisation de ce capteur dans les eaux turbides.

La distribution de la biomasse phytoplanctonique entre les différents groupes sélectionnés dépend essentiellement de la matrice initiale de signatures de fluorescence spectrales utilisée. La matrice initiale du FluoroProbe fournie par le fabricant a été paramétrée en usine sur des souches d'eau douce, et s'est révélée ne pas être adaptée aux populations rencontrées dans l'eau de mer. Les mesures en laboratoire sur des monocultures d'espèces d'eau de mer ont montré un biais entre les chlorophytes qui présentent un signal de fond persistant et les chromophytes. Une nouvelle matrice de SFS a été calibrée en laboratoire (mode « workstation » du fluoroprobe) à partir de souches de micro-algues présentes dans la région. Seule la SFS des chromophytes a été modifiée permettant de diminuer le signal de fond des chlorophytes. Cette nouvelle matrice a été convertie pour les mesures *in situ* (mode « standard » du fluoroprobe), les distributions obtenues pendant les campagnes ont été revues, permettant comme pour l'analyse en laboratoire de réduire le biais induit par les chlorophytes.

Les mesures *in situ* réalisées lors des campagnes de terrain ont également permis de mettre en évidence un biais dans les mesures du FluoroProbe lié au quenching photochimique. Il faudra veiller à réduire le plus possible l'exposition de l'instrument aux rayonnements solaires et définir une fréquence de mesure suffisamment importante pour réduire au maximum ce phénomène

## ANNEXE A : Préparation des milieux de culture

### K medium (Keller et al.,1987) modifié par Ian Probert en Mars 2007 (-Tris-Si-Cu)

Volume à diviser par 2 pour milieu K/2.

Ajouter à 950 mL d'eau de mer naturelle :

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
1.0 mL	NaNO <sub>3</sub>	48.9542 g/L	576 µM
1.0 mL	NH <sub>4</sub> Cl	0.535 g/L	10 µM
1.0 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.8992 g/L	36 µM
1.0 mL	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	30 g/L	245 µM
1.0 mL	FeEDTA solution	cf ci-dessous	cf ci-dessous
1.0 mL	Trace metal solution	cf ci-dessous	cf ci-dessous
1.0 mL	f/2 vitamin solution	cf ci-dessous	cf ci-dessous

Compléter à 1 L avec de l'eau de mer naturelle filtrée sur 1 µm et autoclaver 30 min à 121 °C. Passer le milieu sur membrane filtrante type Stéritop (0.2 µm) et conserver à +4°C.

### FeEDTA solution

Ajouter à 950 mL d'eau MilliQ :

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
4.3 g	(Na)Fe EDTA	-	11.7 µM

Compléter à 1 L avec de l'eau MilliQ, stériliser sur filtre 0.2 µm et stocker à + 4°C.

### Trace metal solution

Ajouter à 950 mL d'eau MilliQ :

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
37,22 g	Na <sub>2</sub> EDTA, 2H <sub>2</sub> O	-	100 µM
1.0 mL	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2.4195 g/L	0.01 µM
1.0 mL	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	23.00 g/L	0.08 µM
1.0 mL	CoSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	14.055 g/L	0.05 µM
1.0 mL	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	178.11 g/L	0.9 µM
1.0 mL	H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1.29 g/L	0.01 µM
1.0 mL	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1.49 g/L	0.000627 µM

Compléter à 1 L avec de l'eau MilliQ, stériliser sur filtre 0.2 µm et stocker à + 4°C.

### f/2 vitamin solution

Ajouter à 950 mL d'eau MilliQ :

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
1 mL	Cyanocobalamin (B12)	0.5 g/L	$3.69 \cdot 10^{-10}$ M
5 mL	Biotin (H)	0.1 g/L	$2.04 \cdot 10^{-9}$ M
100 mg	Thiamine HCl (B1)	-	$2.96 \cdot 10^{-7}$ M

Compléter à 1 L avec de l'eau MilliQ, filtrer sur 0.2  $\mu$ m, répartir dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL et stocker à -20°C.

**Milieu Z8, version 2017, C. Yepremian, MNHN**

Préparation des solutions stocks pour le milieu Z8 :

**Solution stock Z8I**

Solution stock Z8I	Masse (g) pour 1 L
NaNO <sub>3</sub>	46.70
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5.90
ou Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.50

« q.s.p » 1L d'eau MilliQ.  
Autoclaver 20 min à 121°C.

**Solution stock Z8II**

Solution stock Z8II	Masse (g) pour 1 L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ou	3.10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	4.10
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.10

« q.s.p » 1L d'eau MilliQ.  
Autoclaver 20 min à 121°C.

**Solution stock Z8III**

A	Solution A de préparation de la solution Z8III	Masse (g) pour 100 mL
	Fer-solution :	2.80
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	

Dissoudre dans 100 mL d'eau MilliQ, ne pas chauffer ou stériliser.

B	Solution B de préparation de la solution Z8III	Masse (g) Pour 100 mL
	EDTA-solution :	3.7
	EDTANa <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	

Dissoudre au micro-onde dans 100 mL eau MilliQ à 80-90°C, stérilisation facultative.

Pour 1L de solution stock Z8III :

Mélanger : 10 mL de la solution A de Fer  
10 mL de la solution B d'EDTA

« q.s.p » 1L d'eau MilliQ.  
Autoclaver 20 min à 121°C.

### Solution trace

Volume (mL) pour 1 L	Z8 Solutions stocks pour la solution trace	Masse (g) pour 100 mL
1	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.33
1	$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.88
1	KBr	1.20
1	KI	0.83
1	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.87
1	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.55
1	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.46
1	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25
1	$(\text{NH}_4)\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.98
1	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.41
1	$\text{VOSO}_4$	0.080
1	$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.74
10	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3.1
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.6

### Préparation du milieu Z8

N° sol.stock	Volume (mL) pour 1 L
<b>Z8I</b>	10
<b>Z8II</b>	10
<b>Z8III</b>	10
<b>Sol.Trace</b>	1

**Milieu DM2 (Freshwater Diatoms) CCAP modifié par C. Yepremian, MNHN**

Préparation des solutions stocks pour le milieu DM2 :

<b>Volume (mL) pour 1 L</b>	<b>Solutions stocks</b>	<b>Masse (g) pour 200 mL</b>
2	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	4,00
1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.48
0.5	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	10,00
1	NaHCO <sub>3</sub>	3.18
1	EDTA FeNa	0.45
	EDTA Na <sub>2</sub>	0.45
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.496
	MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0.278
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.2
1	Cyanocobalamin	0.008
	Thiamine HCl	0.008
	Biotin	0.008
1	NaSiO <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	11.4



### **Milieu Red Sea Salt BG-11 :**

Préparation de l'eau de mer artificielle Red Sea Salt :

Diluer 33.333 g de Red Sea Salt dans 1 L d'eau milliQ et mettre à autoclaver

Préparation du milieu Red Sea Salt BG11 :

Dans les 1 L d'eau de mer artificielle Red Sea Salt ajouter 20 mL de solution BG-11 (Sigma-Aldrich C3061).

Passer le milieu sur membrane filtrante type Stérifop (0.2  $\mu$ m) et conserver à +4°C.

## ANNEXE B : Procédure d'étalonnage du FluoroProbe avec de l'eau de mer filtrée et de l'eau distillée.

Cette procédure d'étalonnage des offsets du FluoroProbe est à réaliser régulièrement, avant chaque campagne de terrain et avant son utilisation avec la station de travail (après une campagne par exemple).

La calibration est réalisée en deux étapes, la première consiste à effectuer un étalonnage de l'offset en présence d'eau distillée la seconde un étalonnage de l'offset en présence d'eau ultra filtrée.

Une fois la sonde connectée à l'ordinateur, sur le logiciel bbe++, cliquer sur l'onglet *calibration -> offsets (distilled water)*. Plonger la sonde dans le cylindre de calibration rempli d'eau distillée puis cliquer sur **Start** (Figure B1). Une fois la mesure finie cliquer sur **Apply**.

	525	570	610	590	470	UV LED	Trans.
Measurement	0						
Old offset	0	0	0	0	0	0	digits
New offset	0	0	0	0	0	0	digits %

Figure B1 : Etalonnage de l'offset pour l'eau distillée.

Pour l'étalonnage de l'offset de l'eau de mer filtrée, filtrer de l'eau de mer sur une unité de filtration (0.2  $\mu\text{m}$ ) Steritop<sup>TM</sup>. Connecte à l'ordinateur, sur le logiciel bbe++, cliquer sur l'onglet *calibration -> offsets (ultrafiltrated)*. Plonger la sonde dans le cylindre de calibration rempli d'eau de mer filtrée puis cliquer sur **Start** (Figure B2). Une fois la mesure finie cliquer sur **Apply**.

	525	570	610	590	470	UV LED	Trans.
Measurement	0						
Old offset	0	0	0	0	0	0	digits
New offset	0	0	0	0	0	0	digits %

Figure B2 : Etalonnage de l'offset pour l'eau de mer filtrée.

## ANNEXE C : Procédure d'utilisation du FluoroProbe en laboratoire avec sa station de travail « Workstation 25 »

Brancher et allumer l'unité de contrôle (Figure C1)



Figure C1 : Unité de contrôle de la « workstation 25 »

Avant de procéder à la mesure d'un échantillon, veiller à le mettre à l'obscurité au moins 10 minutes avant afin d'éviter le quenching photochimique. Pour cela l'échantillon peut être placé dans la cuve de mesure (25 mL) sous agitation magnétique (réglée à partir de l'unité de contrôle).

Connecter le Fluoroprobe à l'unité de contrôle.

Connecter l'unité de contrôle à l'ordinateur avec le RS232-USB.

Démarrer le logiciel bbe++.

Le logiciel recherche automatiquement la sonde (le port USB clignote). Si la sonde est connectée le rond en haut à gauche de la fenêtre est vert sinon il reste noir (Figure C2). Si la sonde n'est pas connectée, lancer une recherche en cliquant sur le rond noir puis sur « search device ».

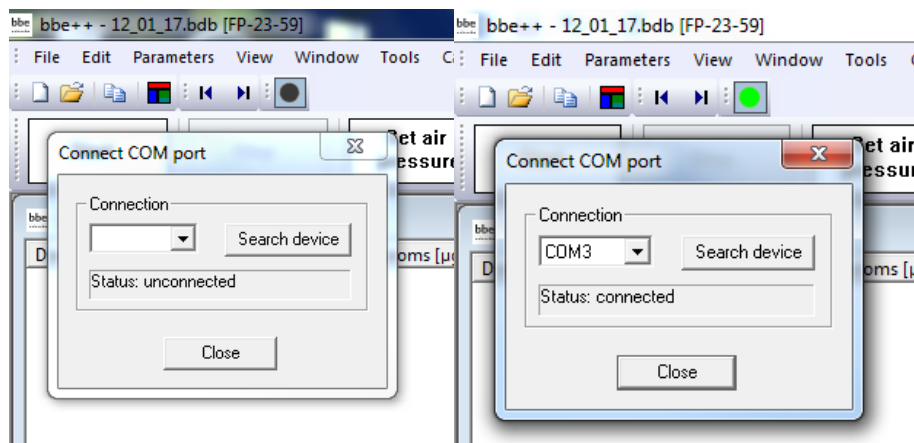


Figure C2 : Connexion du FluoroProbe au logiciel bbe++

Vérifier dans le bas à gauche de la fenêtre la tension du fluoroprobe (qu'il soit chargé, dans la Figure C3 par exemple 12.6V) et vérifier que le jeu de paramètres est le bien « Workstation »

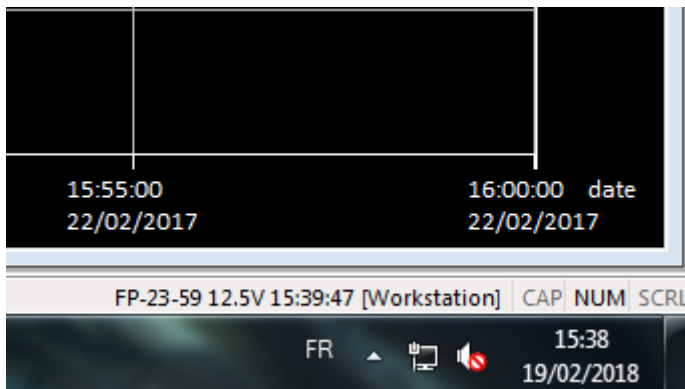


Figure C3 : Identification et tension du FluoroProbe, jeu de paramètres utilisé (ici Workstation).

Si le jeu de données n'est pas le bon, aller dans l'onglet parameters -> parameterset et sélectionné « Workstation »

Ajuster les paramètres du jeu de données si besoin. Pour cela aller dans l'onglet parameters -> online (Figure C4).

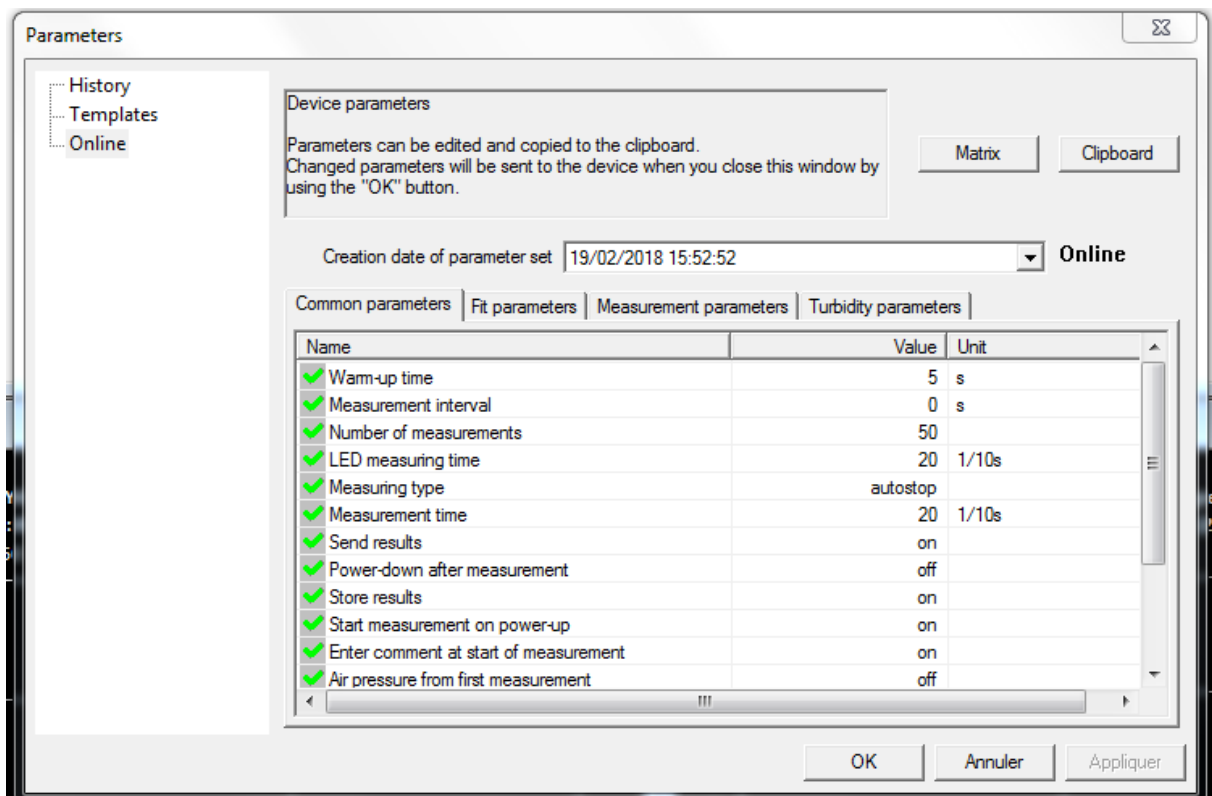


Figure C4 : Configuration des paramètres du FluoroProbe.

Pour que le FluoroProbe fasse un nombre de mesures déterminé, changer la valeur « Number of measurements ». Pour qu'il s'arrête après le nombre de mesures souhaité mettre « Measuring time » sur **autostop**. Si on souhaite arrêter manuellement le FluoroProbe pour faire un nombre de mesures indéterminé sélectionner alors **continuus**.

Pour sélectionner les SFS utilisées, aller sur « Fit parameters » (Figure C5), choisir les groupes de micro-algues souhaitée pour la mesure en mettant **yes** en face de « nom\_de\_l'algue enabled for fit ». Attention seuls 4 groupes peuvent être sélectionnés.

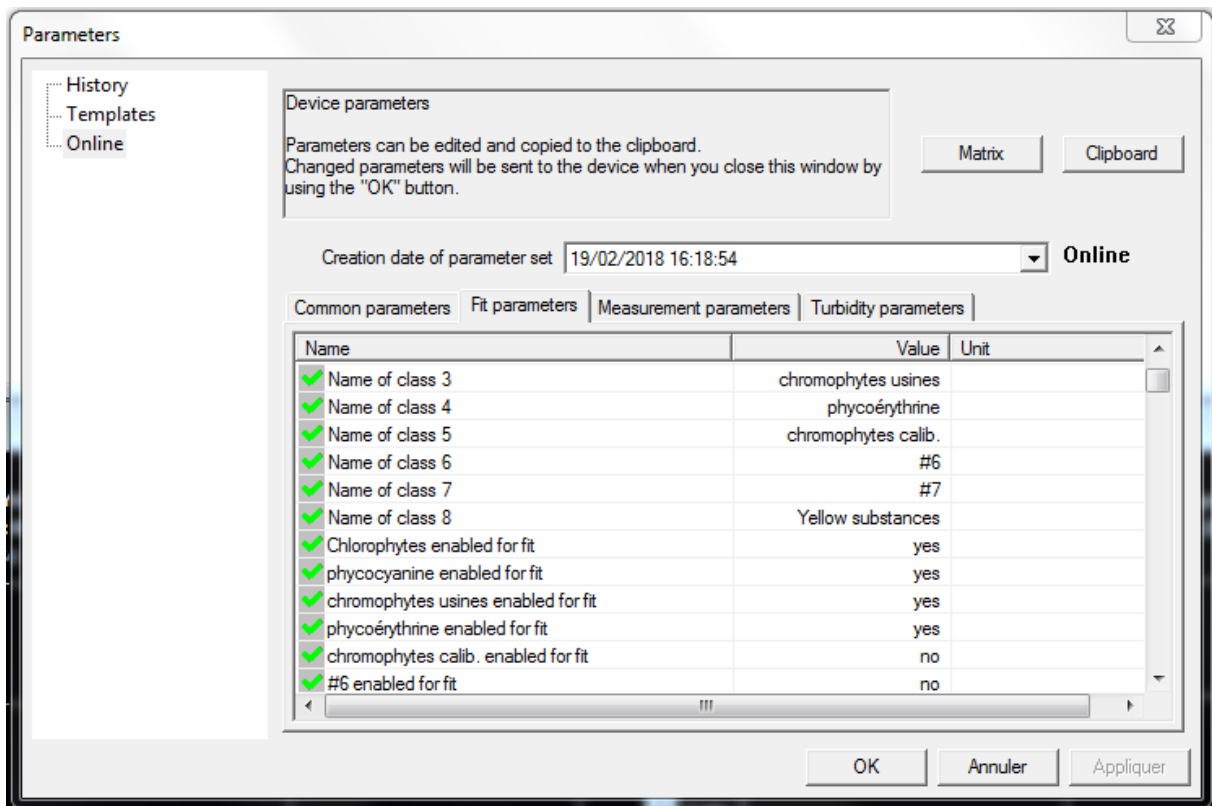


Figure C5 : Sélection des groupes de micro-algues pour les mesures du FluoroProbe.

Une fois les modifications faites, cliquer sur Appliquer puis OK, le FluoroProbe charge alors le nouveau jeu de paramètres.

Pour lancer les mesures, cliquer sur le bouton « Start ». Si un nombre de mesures déterminé avec un autostop a été choisi les mesures s'arrêtent automatiquement après le nombre atteint, si des mesures en continu ont été sélectionnées, cliquer sur le bouton « Stop » pour arrêter les mesures.

## ANNEXE D : Procédure d'utilisation du FluoroProbe en condition *in situ*.

### 1. Réalisation de profils sur la colonne d'eau

Le FluoroProbe peut être utilisé pour réaliser des profils verticaux sur la colonne d'eau. Soit le profil est réalisé sur une faible profondeur et les mesures peuvent être lancées depuis un ordinateur relié à un câble, l'acquisition de données se fait en direct. Soit la profondeur est supérieure à celle du câble et le FluoroProbe est lancé avec un plug (Figure D1), les données sont récupérées à l'issue du profil.



Figure D1 : Mesures du Fluoroprobe en autonome lancées avec le plug.

Connecter le Fluoroprobe à l'ordinateur avec le RS232-USB.

Démarrer le logiciel bbe++.

Le logiciel recherche automatiquement la sonde (le port USB clignote). Si la sonde est connectée le rond en haut à gauche de la fenêtre est vert sinon il reste noir (Figure D2). Si la sonde n'est pas connectée, lancer une recherche en cliquant sur le rond noir puis sur « search device ».

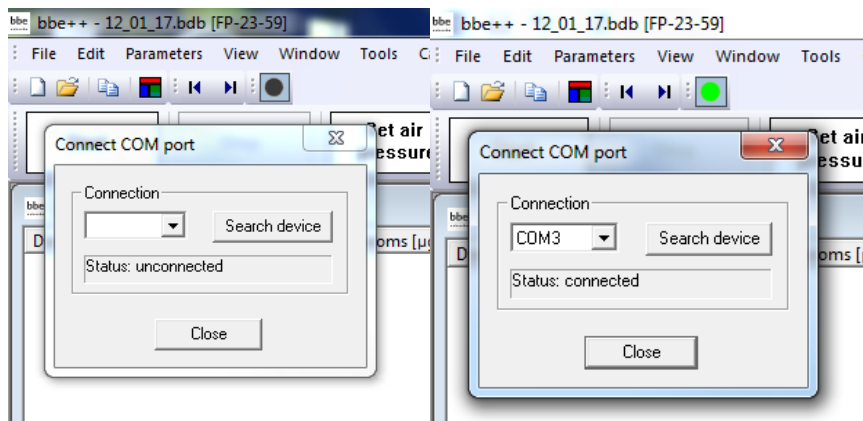


Figure D2 : Connexion du FluoroProbe au logiciel bbe++

Vérifier dans le bas à gauche de la fenêtre la tension du fluoroprobe (qu'il soit chargé, dans la Figure D3 par exemple 12.5V) et vérifier que le jeu de paramètres est le bien « Standard ».

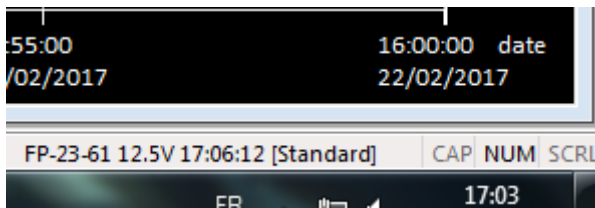


Figure D3 : Identification et tension du FluoroProbe, jeu de paramètres utilisé (ici Standard).

Si le jeu de données n'est pas le bon, aller dans l'onglet parameters -> parameterset et sélectionné « Standard »

Ajuster les paramètres du jeu de données si besoin. Pour cela aller dans l'onglet parameters -> online (Figure D4).

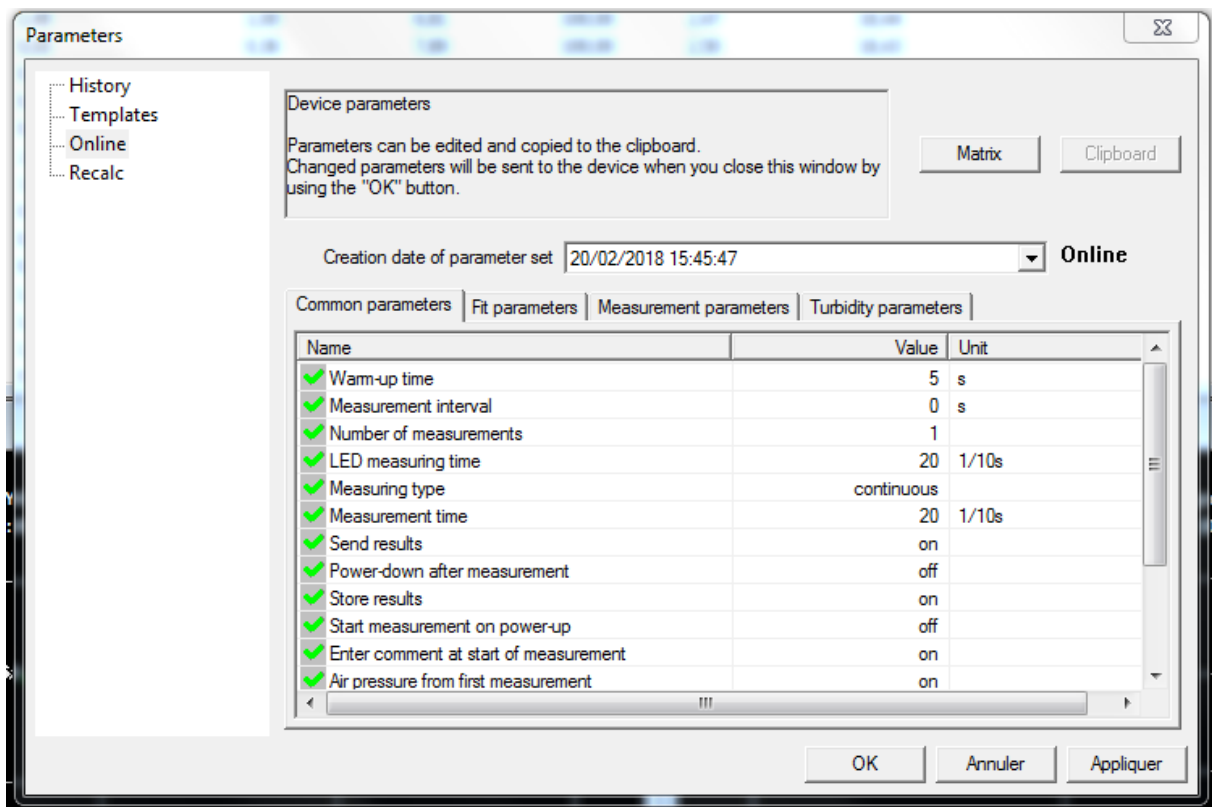


Figure D4 : Configuration des paramètres du FluoroProbe.

Si on choisit d'utiliser le FluoroProbe en autonome (avec le plug), la ligne « Stat measurement on power-up » doit être sur **on**. La sonde sera automatiquement mise en route lorsque le plug sera connecté et s'arrêtera lorsqu'il sera débranché. Si on choisit d'utiliser la sonde branchée à l'ordinateur mettre **off**, la mesure sera déclenchée et arrêtée manuellement à partir du logiciel bbe++.

Pour sélectionner les SFS utilisées, aller sur « Fit parameters » (Figure D5), choisir les groupes de micro-algues souhaitée pour la mesure en mettant **yes** en face de « nom\_de\_l'algue enabled for fit ». Attention seuls 4 groupes peuvent être sélectionnés.

Cliquer sur Appliquer puis OK, le FluoroProbe charge alors le nouveau jeu de paramètres.

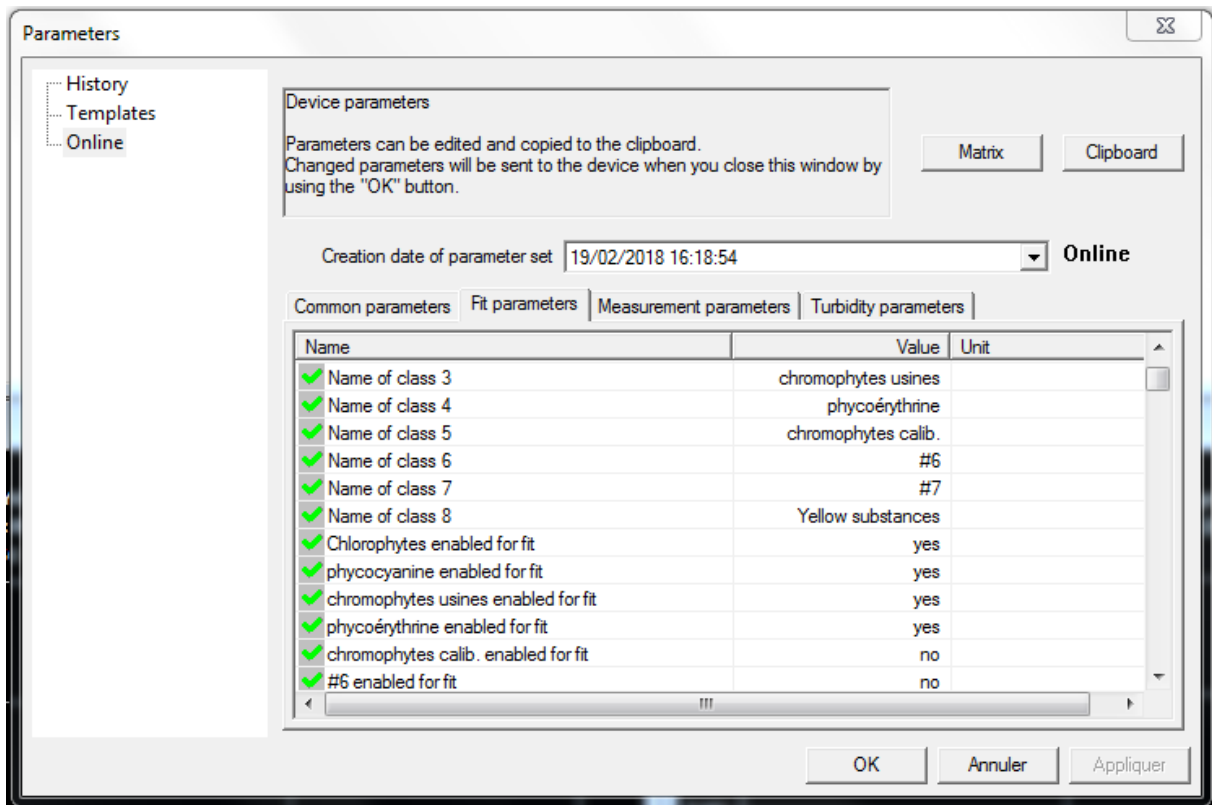


Figure D5 : Sélection des groupes de micro-algues pour les mesures du FluoroProbe.

Une fois la mesure réalisée, les données peuvent être récupérées en branchant le système plug + USB à la sonde (préconisé, Figure D6). Le transfert des données de la sonde à la clef USB est terminé quand la LED rouge de la clef reste allumée sans clignoter. Les données peuvent également être récupérées via l'interface bbe++ en branchant la sonde à un ordinateur. Pour cela dans le logiciel bbe++, cliquer sur le bouton « get data »



Figure D6 : Récupération des données avec le système plug + USB.



## 2. Utilisation en mode mouillage

Le FluoroProbe peut être utilisé en mode mouillage pour acquérir un jeu de données haute-fréquences sur de longue période.

Comme pour réaliser des profils, soit la sonde est utilisée en mode autonome avec un plug qui déclenche la mesure lorsqu'il est branché, soit la sonde est branchée à un ordinateur et la mesure est déclenchée manuellement à partir du logiciel bbe++.

Ajuster les paramètres du jeu de données si besoin. Pour cela aller dans l'onglet parameters -> online (Figure D7).

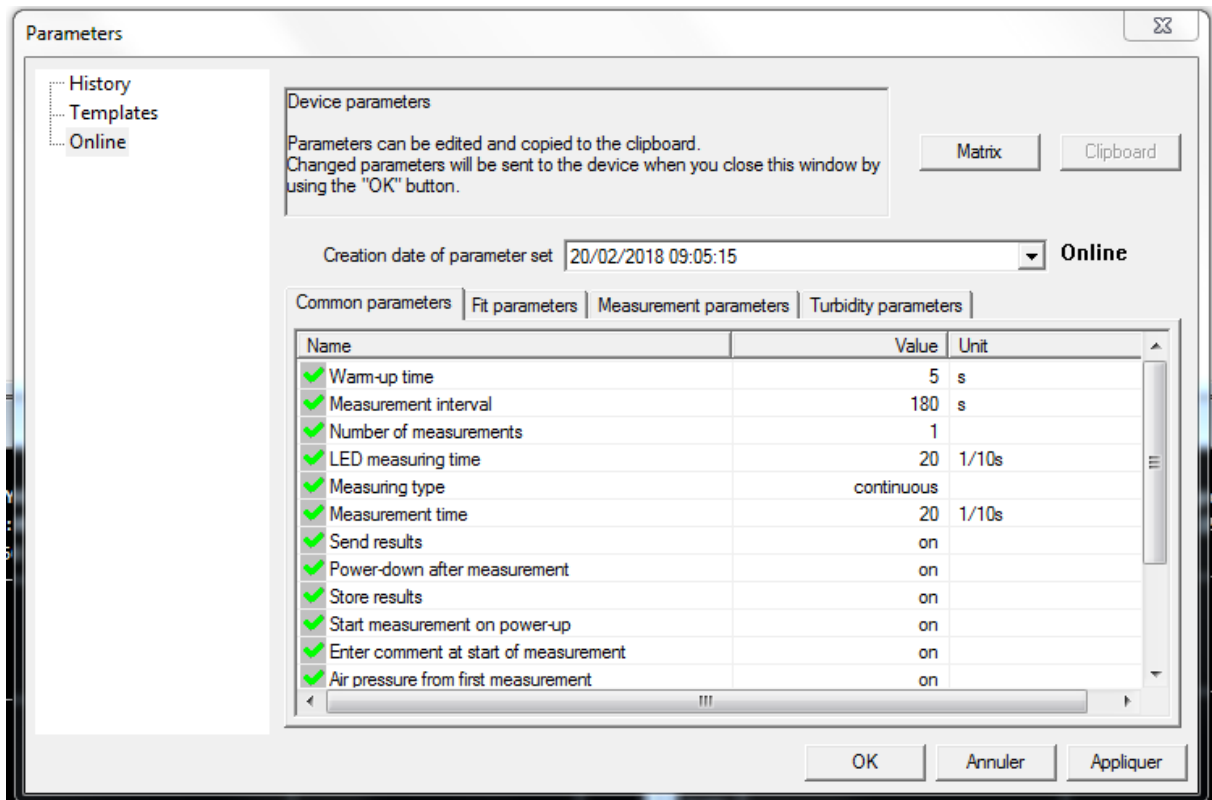


Figure D7 : Configuration des paramètres du FluoroProbe.

Pour choisir l'intervalle de temps entre 2 mesures ajuster la valeur en face de « Measurement interval » (par exemple sur la figure xx une mesure toutes les 180 s).

Afin de réduire la consommation électrique du FluoroProbe, si l'intervalle de mesure est suffisamment important, prévoir d'éteindre la sonde après chaque mesure. Pour cela, mettre **yes** sur la ligne « Power-down after measurement ».

La récupération des données avec le plug+USB lorsque le mode « Power-down after measurement » est activée s'est révélée parfois compliquée. Lorsque le transfert avec le plug+usb échouait une solution consistait à brancher directement la sonde à un ordinateur en se rendant sur le logiciel bbe++ et à lancer le transfert des données manuellement en cliquant sur le bouton « get data ».